



INSTITUTO DE  
ACUICULTURA



**XUNTA DE GALICIA**  
**CONSELLERÍA DE PESCA**  
**E ASUNTOS MARÍTIMOS**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO PATOLÓGICO DE LAS POBLACIONES  
DE BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE  
GALICIA**

Memoria presentada por

**David Iglesias Estepa**

para optar al Grado de Doctor

2006



Los doctores María Jesús Carballal Durán y Antonio Villalba García, investigadores del Centro de Investigacións Mariñas de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos (Xunta de Galicia),

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Estudio patológico de las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* (L.) de Galicia”**, que presenta D. David Iglesias Estepa para optar al Grado de Doctor en Ciencias del Mar, ha sido realizado bajo su dirección y, considerándolo concluido, autorizan su presentación a fin de que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Vilanova de Arousa, 17 de abril de 2006

Fdo. Dra. María Jesús Carballal Durán

Fdo. Dr. Antonio Villalba García





Este trabajo ha sido desarrollado en el Centro de Investigaciones Mariñas de Corón (Vilanova de Arousa), siendo financiado parcialmente por el proyecto de investigación PGIDT-CIMA-99/7: “Estudio de una neoplasia diseminada y otras alteraciones patológicas que afectan a las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* de las Rías Gallegas”.

David Iglesias Estepa disfrutó de una beca de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos (Xunta de Galicia), para la realización de tesis doctorales en temas de investigación marina, entre diciembre de 1998 y junio de 2003.

Parte del trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B. & Villalba, A. 2001. Parasites and Pathologic Conditions of the cockle *Cerastoderma edule* Populations of the Coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 87-97.
- Carballal, M.J., Villalba, A., Iglesias, D. & Hine, P.M. 2003. Virus-like particles associated with large foci of heavy hemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 84: 234-237.
- Iglesias, D., Carballal, M.J. & Villalba, A. 2004. Gonadal cycle of the cockle *Cerastoderma edule* of Galicia (NW Spain). *European Aquaculture Society Special Publication*, 34: 432-433.



**A mi familia**

**A Isa**

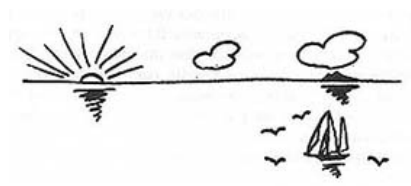




*“Qué pena no ser ave de paso  
ni derrota de carta marina.*

*Qué lento ser ciprés viviendo erguido  
al cielo y saber que todo en este  
mundo necesita su tiempo”*

Extraído de *Una tarde de sol* de Manolo  
García.



## AGRADECIMIENTOS

Cuando la finalización de un trabajo se demora tanto en el tiempo, como ha sido el caso de éste, son muchas las personas que se ven implicadas en el desarrollo del mismo y, por tanto, mayor la probabilidad de cometer algún lamentable olvido. Vaya por delante el agradecimiento a toda la gente que ha contribuido a que este trabajo de tesis llegase a buen puerto y que, tal vez, no se vea adecuadamente reconocida en estas escasas líneas que se incluyen a continuación.

En primer lugar, como no podía ser de otra manera, mi agradecimiento a mis directores de tesis, M<sup>a</sup> Jesús Carballal y Antonio Villalba, por la confianza depositada en mí, por todo el tiempo que me han dedicado (que ha sido mucho) y por no haber cejado en el empeño de que este trabajo saliese adelante. A ellos les debo todo lo que sé de patología de organismos marinos y nunca les estaré lo suficientemente agradecido por la paciencia que conmigo han demostrado.

A M<sup>a</sup> Isabel Meléndez y Elena Penas, que me *adoptaron* a su cargo en el laboratorio e hicieron que me sintiese como en casa desde el primer día. Ellas, junto con mis compañeras de fatigas: Josune Benito y Mónica Pazos, han sido las verdaderas responsables de que, contra viento y marea, se realizasen todos los muestreos programados y el procesamiento de los berberechos recolectados. Han pasado también otras muchas personas, a lo largo de estos años, por el laboratorio de patología del CIMA: Begoña González, Ana Rivas, M<sup>a</sup> Jesús Llevot, Ana Iglesias, Ana González, Loli Domínguez, María Angueira, Susana Goldar, y otras de las que probablemente me olvido, becarias de formación que han contribuido en gran medida a que éste, y otros trabajos de investigación, saliesen adelante. Sirvan estas líneas de humilde reconocimiento.

Al Dr. José Molares, para mí un referente profesional y humano, que me dio la oportunidad de iniciarme en temas de investigación marina y que, durante el desarrollo de este trabajo, siempre ha tenido tiempo para sentarse un rato conmigo y orientarme en diferentes aspectos relacionados con el estudio de la dinámica de poblaciones de berberecho. Deseo agradecer al Dr. José Fuentes toda la atención personal y profesional prestada, especialmente por el asesoramiento en temas de estadística. A las Dras. Carmen López y Susana Darriba, por compartir conmigo sus resultados sobre patología de solénidos y permitirme así continuar aprendiendo. Por confiar en mí y animarme a continuar en momentos de duda.

A mis compañeros de beca de generaciones anteriores: Fran, Susana y Mónica, por lo que en su momento compartimos y que siempre quedará; a mis colegas de “ruta”: Cris, Marga, Josune, Antonio, Columba y Gema, por las conversaciones y emociones compartidas en los miles de kilómetros de carretera realizados en los viajes de ida y vuelta a Santiago. A mis camaradas de promoción, Rafa y Gonzalo, para que se animen a darle un empujón a sus tesis y así dejemos paso a las generaciones que vienen. A Pili y Seila, que vienen pisando fuerte y bien, para que nos dejen acabar antes a los viejos del lugar. A Asun, Elvira y Sandra, por proporcionar el clima personal y laboral extraordinario que necesitaba para acabar por fin lo que me traía entre manos desde hace tanto tiempo.

A Juan Luis, por resolver diligentemente todas mis dudas y problemas informáticos. Por los bocadillos gigantes de chistorra picante compartidos durante mi estancia en Vilagarcía.

A Manel, Maricarmen, Paula y José Manuel, por los mil favores realizados, por marearles y romperles la cabeza a horas a veces imperdonables, por estar *siempre* (en el sentido literal de la palabra) ahí y por no haberles visto jamás en todos estos años una mala cara. A Chita, Josefa, Domitila, Pilar y M<sup>a</sup> José, por su callada (o no tanto) compañía y por hacer más llevaderas las largas tardes de CIMA. A todos ellos, que constituyen los verdaderos pilares del CIMA, muchísimas gracias.

A Pepe, Pablo y Gonzalo, que siempre dieron solución a mis problemas administrativos, aún cuando mi dejadez implicase el hacerlo el último día a apenas un minuto de que acabase el plazo de la gestión correspondiente.

Al resto de personal del CIMA, que a golpe de pasillo o coincidiendo en la máquina del café, me han solucionado mil dudas peregrinas del momento y que con un comentario, una sonrisa, una mirada... me han animado a continuar.

Al personal de las cofradías de Noia “San Bartolomé”, A Illa de Arousa “San Xulián, O Vicedo, Foz y Cambados “San Antonio”, por su colaboración en los muestreos realizados. Al INTECMAR por facilitarnos los datos ambientales correspondientes a su red de seguimiento de condiciones oceanográficas y que resultaron fundamentales en el presente estudio.

A Daniel Cerdeira, Olga Teijeiro y Fernanda Martín por su ayuda en los muestreos de Foz; a Carmen Barcia y Begoña Serra por su colaboración en la recolección de berberechos efectuada en *Villabril*; a Guillermo del Río por los registros de salinidad y temperatura correspondientes a este mismo banco; a Xusto Otero y Miguel Losada por realizar los muestreos en *Lombos do Ulla* y a José Alberto de Santiago por su colaboración en los muestreos realizados en el banco de *Sarrido*.

A Suso Méndez, Inés Pazos, Ana Sánchez y Bibiana Torres, del CACTI de la Universidad de Vigo, por su asistencia técnica en el desarrollo de las técnicas de microscopía electrónica.

A Fernanda Russell-Pinto por acojirme tan amablemente en su laboratorio del Instituto de Ciencias Biomédicas de Abel-Salazar de Porto e introducirme en el mundo de los trematodos.

A Aad Smaal por recibirme en el laboratorio del Netherlands Institute for Fisheries Research de Yerseke, a Pauline Kammermans por sus explicaciones acerca de la gestión de las poblaciones de berberecho de Holanda. A Marianne Alumno-Bruscia por organizar mi estancia en Holanda, por ayudarme en los muestreos allí realizados y en definitiva por su amistad. *Merci beaucoup, Rianne!*

A Adriana que supuso un soplo, o diré mejor un huracán, de aire fresco en una etapa dura y engorrosa, tanto a nivel de trabajo como personal. A Antonio Gómez, por las jornadas compartidas dentro y fuera del chollo, por tener el arrojo de dejar esto y apostar por sus ilusiones. A Marta Andrade, por ser mi compañera de piso en mi breve

estancia vilagarciana, por los cafés y los paseos compartidos, por descubrirme a El principito y a Alessandro Baricco y sobre todo por no ser *comme il faut*.

A Luis Rodriguez por su inyección de energía y vitalidad. Por demostrarme que queda mucho por hacer y que ser funcionario no es sinónimo de apoltronamiento y hastío.

A los artífices de los programas de R3: *Siglo XXI*, *La Ciudad Invisible*, *Sateli3* o *La Bañera de Ulises*, que tan buenos momentos me hicieron pasar durante jornadas maratónicas pasadas en el microscopio.

A mis amigos de siempre Marcos, Mai, Toni, Marce, Andrés, Ángel, Carlos, por estar ahí y saber que puedo contar con ellos a pesar del paso del tiempo.

A las Auroras, por ser mis madres adoptivas durante el año largo que pase en Palmeira.

A mi familia, por su apoyo y soporte durante todo este tiempo, especialmente en los momentos bajos. A mis padres, por la paciencia demostrada y por haber apoyado todos mis proyectos románticos, desde niño hasta la actualidad, sin haberlos cuestionado nunca y sin pedir nada a cambio. Por haber sido un ejemplo a seguir.

A Raque y Afonso, por su tenacidad e ilusión. A Yago por su torbellino de energía positiva.

A mi *abuela de Luna*, *abuela de Pedriña*, a Mechi, Mari, el tío Juan y Monique.

A Isa, por su generosidad, por aportarme la estabilidad que tanto necesitaba. Por hacer fácil lo difícil. Por ocuparse de la intendencia y no dejar que me deshidratase ni desnutriese durante la escritura de esta memoria... Por enseñarme que camisa y chándal no combinan bien... Por hacerme ver que hay vida más allá de la tesis, y en definitiva por ser la mujer del *Lumpa-lumpa perezoso*, *gordinflón* y *calamidad*...





## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**A3:** Estación Arousa 3 (red de control de condiciones oceanográficas INTECMAR).

**A7:** Estación Arousa 7 (red INTECMAR)

**CACTI:** Centro de Apoyo Científico Tecnológico a la Investigación de la Universidad de Vigo.

**CS:** Citospin Smear

**CTD:** sonda registradora de conductividad (salinidad), temperatura y profundidad

**DE:** desviación estándar

**EDG:** Estadios de desarrollo gonadal

**EE:** Error estándar

**FC:** Frotis hemocitarios realizados mediante citocentrifugación

**FGIHI:** Focos grandes de infiltración hemocitaria intensa

**FP:** Frotis hemocitarios en portaobjetos tratados con poli-L-lisina

**GL:** grados de libertad

**Ho:** Hipótesis nula

**HT:** Histological techniques

**IC:** Índice de condición

**IG:** Índice gonadal

**IA:** Infección/infestación avanzada

**IL:** Infección/infestación ligera

**IM:** Infección/infestación moderada

**INM:** Instituto Nacional de Meteorología

**INTECMAR:** Instituto tecnolóxico para o control do medio mariño

**L:** Longitud antero-posterior

**LFHHI:** large foci of heavy hemocytic infiltration

**M:** Molar (unidades de concentración)

**M3:** Estación Muros 3 (red de control INTECMAR)

**M7:** Muros 7 (red INTECMAR).

**MEB:** Microscopía electrónica de barrido

**MET:** Microscopía electrónica de transmisión

**NI:** No infección/infestación

**NO:** Noroeste

**ns:** diferencias estadísticamente no significativas

**NW:** Northwest

**OIE:** Oficina Internacional de Epizootias

**P:** Probabilidad estadística de que la hipótesis nula sea cierta.

**PCBs:** Polychlorinated Biphenyls

**PS:** Poly-L-lisine smear

**r<sub>s</sub>:** coeficiente de correlación por rangos de Spearman

**S:** salinidad

**T:** temperatura

**TH:** Técnicas histológicas

**χ<sup>2</sup>:** Estadístico chi-cuadrado



# ÍNDICE

---





## ÍNDICE:

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
I.1. Producción de berberecho en Galicia .....	3
I.2. Parásitos y alteraciones patológicas de <i>Cerastoderma edule</i> .....	3
I.3. Neoplasia diseminada .....	4
I.4. Trematodos digeneos que afectan a bivalvos marinos .....	8
I.4.1. Bivalvos como primeros hospedadores intermediarios de digenea .....	10
I.4.2. Bivalvos como segundos hospedadores intermediarios de digenea ...	11
I.5. Interés de los estudios patológicos de moluscos bivalvos .....	12
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>III. PARÁSITOS Y ALTERACIONES PATOLÓGICAS DE LAS POBLACIONES DE BERBERECHO <i>Cerastoderma edule</i> (L.) DE LA COSTA DE GALICIA .....</b>	<b>19</b>
III.1. RESUMEN / SUMMARY .....	21
III.2. INTRODUCCIÓN .....	22
III.3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	23
III.4. RESULTADOS .....	25
III.4.1. Neoplasia .....	25
III.4.2. Organismos de tipo bacteriano .....	26
III.4.3. Protozoos .....	28
III.4.4. Metazoos .....	32
III.4.5. Reacciones hemocitarias .....	36
III.4.6. Comparaciones entre los diferentes bancos naturales .....	36
III.5. DISCUSIÓN .....	38

<b>IV. ESTUDIO DE UNA NEOPLASIA DISEMINADA EN EL BERBERECHO <i>Cerastoderma edule</i> (L.) DE LA COSTA DE GALICIA (I). CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA Y COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA</b>	<b>43</b>
IV.1. RESUMEN .....	45
SUMMARY .....	46
IV.2. INTRODUCCIÓN .....	47
IV.3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	49
IV.3.1. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD .....	49
IV.3.1.1. Análisis de cortes histológicos .....	50
IV.3.1.2. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión .....	50
IV.3.2. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA .....	51
IV.3.2.1. Recolección de las muestras .....	51
IV.3.2.2. Extracción de hemolinfa .....	52
IV.3.2.3. Diagnóstico histológico .....	53
IV.3.2.4. Técnica de adhesión de hemocitos a portaobjetos mediante citocentrifugación .....	53
IV.3.2.5. Técnica de adhesión de hemocitos a portaobjetos tratados con poli-L-lisina .....	53
IV.3.2.6. Sensibilidad de diagnóstico .....	54
IV.3.2.7. Estimación de la intensidad .....	54
IV.4. RESULTADOS .....	56
IV.4.1. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD .....	56
IV.4.1.1. Análisis de cortes histológicos .....	56
IV.4.1.2. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión .....	59



V.4.2. EFECTOS DE LA NEOPLASIA DISEMINADA EN LA CONDICIÓN .....	98
V.5. DISCUSIÓN .....	100
<b>VI. TREMATODOS DIGENEOS QUE AFECTAN A LAS POBLACIONES DE BERBERECHO <i>Cerastoderma edule</i> (L.) DE LA COSTA DE GALICIA .....</b>	<b>107</b>
VI.1. RESUMEN .....	109
SUMMARY .....	110
VI.2. INTRODUCCIÓN .....	111
VI.3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	113
VI.3.1. Recolección de los berberechos y aislamiento de los trematodos .....	113
VI.3.2. Análisis de cortes histológicos .....	114
VI.3.3. Procesamiento de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido .....	115
VI.3.4. Dinámica de infestación por esporoquistes de <i>Labratrema minimus</i> (Bucephalidae) .....	115
VI.3.5. Correlación con variables ambientales .....	116
VI.3.6. Relación con la edad .....	116
VI.3.7. Efectos de la infestación por <i>L. minimus</i> en la condición de <i>C. edule</i> .....	117
VI.4. RESULTADOS .....	118
VI.4.1. Especies de trematodos encontradas en berberechos de Galicia .....	118
VI.4.2. Dinámica de infestación por <i>Labratrema minimus</i> . Correlación con variables ambientales .....	127
VI.4.3. Relación con la edad .....	131
VI.4.4. Efectos de la infestación por <i>L. minimus</i> en la condición de <i>C. edule</i> .....	131
VI.5. DISCUSIÓN .....	132



<b>VII. ENFERMEDAD DE LOS FOCOS GRANDES DE INFILTRACIÓN HEMOCITARIA INTENSA (FGIHI) QUE AFECTA AL BERBERECHO <i>Cerastoderma edule</i> (L.) DE LA COSTA DE GALICIA .....</b>	<b>141</b>
VII.1. RESUMEN .....	143
SUMMARY .....	144
VII.2. INTRODUCCIÓN .....	145
VII.3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	145
VII.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI .....	145
VII.3.1.1. Análisis de cortes histológicos .....	146
VII.3.1.2. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión .....	147
VII.3.2. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHIH .....	147
VII.3.2.1. Dinámica temporal .....	147
VII.3.2.2. Correlación con variables ambientales .....	149
VII.3.2.3. Relación con la edad .....	150
VII.3.3. EFECTOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI EN LA CONDICIÓN .....	151
VII.4. RESULTADOS .....	152
VII.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI .....	152
VII.4.1.1. Análisis de cortes histológicos .....	152
VII.4.1.2. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión .....	153
VII.4.2. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHIH .....	156
VII.4.2.1. Dinámica temporal .....	156
VII.4.2.2. Correlación con variables ambientales .....	161
VII.4.2.3. Relación con la edad .....	167

VII.4.3. EFECTOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI EN LA CONDICIÓN .....	168
VII.5. DISCUSIÓN .....	169
<b>VIII. CICLO GONADAL DEL BERBERECHO <i>Cerastoderma edule</i> (L.) DE LA COSTA DE GALICIA .....</b>	<b>173</b>
VIII.1. RESUMEN/SUMMARY .....	175
VIII.2. INTRODUCCIÓN .....	176
VIII.3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	177
VIII.3.1. Estaciones de muestreo .....	177
VIII.3.2. Evaluación de la condición gonadal .....	178
VIII.3.3. Parámetros ambientales .....	182
VIII.4. RESULTADOS .....	183
VIII.4.1. Sexualidad y relación entre sexos (sex ratio) .....	183
VIII.4.2. Ciclo gametogénico .....	184
VIII.4.3. Parámetros ambientales .....	191
VIII.5. DISCUSIÓN .....	193
<b>IX. INFLUENCIA DE VARIAS ALTERACIONES PATOLÓGICAS SOBRE LA CONDICIÓN GONADAL DEL BERBERECHO <i>Cerastoderma</i> <i>edule</i> (L.) DE LA COSTA DE GALICIA: NEOPLASIA DISEMINADA, ESPOROQUISTES DE <i>Labratrema minimus</i> Y ENFERMEDAD DE LOS FOCOS GRANDES DE INFILTRACIÓN HEMOCITARIA INTENSA .....</b>	<b>199</b>
IX.1. RESUMEN .....	201
SUMMARY .....	202
IX.2. INTRODUCCIÓN .....	203
IX.3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	204
IX.3.1. Poblaciones estudiadas .....	204
IX.3.2. Determinación de la condición gonadal y cuantificación de la intensidad de cada alteración patológica .....	204

IX.3.3. Análisis estadísticos .....	205
IX.4. RESULTADOS .....	206
IX.4.1. Ciclo gonadal y dinámica temporal de la neoplasia diseminada .....	206
IX.4.2. Efectos de la neoplasia diseminada en el desarrollo gonadal .....	207
IX.4.3. Asociación entre la neoplasia diseminada y el sexo .....	211
IX.4.4. Ciclo gonadal y dinámica temporal de infestación por esporoquistes de <i>Labratrema minimus</i> .....	212
IX.4.5. Efectos de los esporoquistes de <i>Labratrema minimus</i> en el desarrollo gonadal .....	214
IX.4.6. Asociación entre la parasitación por esporoquistes de <i>Labratrema minimus</i> y el sexo .....	217
IX.4.7. Ciclo gonadal y dinámica temporal de la enfermedad de los FGIHI .....	218
IX.4.8. Efectos de la enfermedad de los FGIHI en el desarrollo gonadal .....	219
IX.4.9. Asociación entre la enfermedad de los FGIHI y el sexo .....	224
IX.5. DISCUSIÓN .....	226
<b>X. CONCLUSIONES .....</b>	<b>233</b>
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>237</b>



## **I. INTRODUCCIÓN GENERAL**

---





## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### I.1. Producción de berberecho en Galicia

Las poblaciones de berberecho presentes en las rías gallegas corresponden mayoritariamente a la especie *Cerastoderma edule* (Linnaeus 1758), aunque también existen poblaciones de *Cerastoderma glaucum* (Poiret 1789). Este molusco bivalvo, que se conoce comúnmente como berberecho o croque, constituye una de las principales especies explotadas en el ámbito del marisqueo en Galicia. La producción media entre los años 1998 y 2004 se situó en torno a las 3000 toneladas anuales, alcanzando una facturación media anual de primera venta de algo más de 7 millones de euros. Sin embargo, es el hecho del gran número de personas cuya actividad laboral se centra en la recolección de ésta y otras especies de bivalvos –cerca de 7000 permisos de explotación de marisqueo a pié en la anualidad 2000-2001 (CES 2001)- la que le confiere a este recurso un cierto valor social por constituir una de las principales actividades económicas de muchos municipios costeros.

### I.2. Parásitos y alteraciones patológicas de *Cerastoderma edule*

Estudios realizados en otros países mostraron que el berberecho *C. edule* era hospedador de bacterias, protistas (*Marteilia* sp., *Perkinsus* sp., gregarinas, microsporidios, haplosporidios) y metazoos –como turbelarios, trematodos, copépodos- (Lauckner 1983; Bower *et al.* 1994). Algunos de estos parásitos, como los trematodos, han presentado prevalencias e intensidades de infestación muy elevadas, originando graves lesiones en berberecho y provocando en ocasiones importantes mortandades (Lauckner 1983; Jonsson & André 1992; Goater 1993; Bowers *et al.* 1996). Otros, como *Marteilia* sp. –descrito en *C. edule* de Francia (Comps *et al.* 1975)- causaron importantes problemas patológicos en *Ostrea edulis* y *Mytilus galloprovincialis* (Lauckner 1983; Figueras & Montes 1988; Villalba *et al.* 1993a, b). Parásitos de tipo *Perkinsus* fueron encontrados en diferentes especies de bivalvos y también en berberecho *C. edule* de Italia (Da Ros & Canzonier 1985). *Perkinsus olseni* (=atlanticus) ha sido relacionado con mortandades de almeja fina, especialmente en épocas estivales en las que las almejas estaban sometidas a condiciones de estrés relacionadas con temperaturas elevadas en el agua de las zonas de cultivo (Villalba *et al.* 2005). En poblaciones de *C. edule* del sur de Irlanda (Twomey & Mulcahy 1984) y de la Bretaña francesa (Poder & Auffret 1986) se detectaron neoplasias diseminadas de

posible origen hemocitario, que fueron relacionadas con mortalidad (Twomey & Mulcahy 1988b). Enfermedades neoplásicas similares afectan a diferentes especies de bivalvos marinos en Galicia y otras partes del mundo y han sido asociadas con mortalidades masivas en las costas de Estados Unidos y Europa (Peters 1988; Elston *et al.* 1992; Rodriguez *et al.* 1997; Villalba *et al.* 2001; Carballal *et al.* 2001; Barber 2004).

### **I.3. Neoplasia diseminada**

La neoplasia es una alteración del crecimiento caracterizada por la proliferación excesiva y anormal de células, de manera independiente del patrón normal de crecimiento definido por los mecanismos reguladores del organismo, y que persiste aún después de finalizado el estímulo que originó el crecimiento (Sparks 1985). Desde finales de los años 60 han sido numerosas las citas de dos tipos principales de neoplasia que afectan a moluscos bivalvos marinos a lo largo de todo el mundo: neoplasia diseminada y neoplasia gonadal (Elston *et al.* 1992; Landsberg 1996; Barber 2004). Se han documentado también otros tipos de neoplasia –como la neoplasia branquial descrita en *Macoma balthica* (Christensen *et al.* 1974; Farley 1976)- que debido a su alta capacidad invasiva fueron frecuentemente confundidos con la neoplasia diseminada (Landsberg 1996).

La neoplasia denominada actualmente diseminada fue citada por primera vez en ostras *Crassostrea virginica* y *C. gigas* y en mejillón *Mytilus edulis* (Farley 1969a, b), con el nombre de “enfermedad sarcomatosa proliferativa”. Esta alteración consiste básicamente en la proliferación extensiva, en los senos de la hemolinfa y en espacios del tejido conjuntivo, de células circulantes anormales con un núcleo de tamaño relativamente grande, una elevada relación núcleo:citoplasma, y una alta frecuencia de figuras mitóticas (Peters 1988; Elston *et al.* 1992). A partir de la primera cita de Farley (1969a, b) diferentes autores describieron alteraciones similares en diferentes moluscos, empleando términos diferentes como neoplasia hemocitaria, sarcoma diseminado, leucemia y otros. La designación de los cánceres en vertebrados se ha basado principalmente en el tejido de origen, y éste no ha sido convincentemente establecido para la mayor parte de este tipo de desórdenes en bivalvos (Elston *et al.* 1992). La corriente más extendida relaciona la neoplasia diseminada con un origen hemocitario; sin embargo, pese a la existencia de evidencias que apuntan a dicha hipótesis, hasta el momento esto no ha sido demostrado y el término neoplasia hemocitaria constituye un



error debido a que el órgano hematopoyético de bivalvos no se conoce todavía. Como propone Elston *et al.* (1992) es preferible el uso del término más conservador “neoplasia diseminada” para referirse a este tipo de alteración. Este criterio es el que se seguirá en la presente memoria.

En cuanto a los factores responsables de la neoplasia diseminada, éstos no han sido claramente definidos, de manera que la etiología de la enfermedad es todavía desconocida (Elston *et al.* 1992; Barber 2004). El hecho de que la neoplasia diseminada pueda ser transmitida entre individuos (Brown 1980; Twomey & Mulcahy 1988b; Elston *et al.* 1988b; Kent *et al.* 1991; McLaughlin 1994; Sunila 1994; Collins *et al.* 2003), y la súbita aparición de niveles elevados de prevalencia y mortalidad en poblaciones previamente libres de neoplasia (Farley *et al.* 1986; McGladdery *et al.* 2001) sugieren que puede estar implicado un agente infeccioso (Barber 2004). Está generalmente aceptado que si un agente infeccioso es responsable de la neoplasia diseminada, éste es de naturaleza viral o subviral (Elston *et al.* 1992). Hasta el momento, mediante la observación ultraestructural de células neoplásicas no se ha tenido constancia real de la presencia de partículas virales en el núcleo de estas células (Elston *et al.* 1992, Barber 2004). En el caso de *Mya arenaria* se ha responsabilizado a un retrovirus aislado a partir de almejas afectadas por neoplasia de provocar la enfermedad (Oprandy *et al.* 1981; Oprandy & Chang 1983). Estos autores inocularon en almejas sanas virus purificados aislados a partir de almejas con neoplasia, desarrollándose tumores en la mayor parte de las almejas inyectadas, en los dos meses siguientes. A partir de estas almejas se aislaron de nuevo virus, que fueron inoculados a su vez en almejas sanas. La mayor parte de éstas desarrollaron neoplasia, cumpliéndose así los postulados de Koch. La ausencia de repetibilidad de los resultados, en intentos posteriores realizados por otros investigadores, ha puesto en entredicho estos estudios (Elston *et al.* 1992). Actualmente la detección de actividad transcriptasa inversa en células neoplásicas de *M. arenaria* (House *et al.* 1998) y *C. edule* (Romalde *et al.* 2005) y no en células procedentes de organismos sanos, constituye una prueba favorable a la implicación de un retrovirus en el desarrollo de la neoplasia diseminada. Otro tipo de factores, como agentes contaminantes –del tipo de los hidrocarburos (Farley 1969b; Yevich & Barszcz 1977; Mix *et al.* 1981; Mix 1982) o PCBs (Reinisch *et al.* 1984)- y biotoxinas (Landsberg 1996), han sido relacionados con el desarrollo de neoplasia diseminada en moluscos bivalvos, sin embargo no han podido establecerse relaciones

causa-efecto entre estos factores y el desarrollo de neoplasia (Cheng 1993; Barber 2004).

El hecho de que unas especies de bivalvos sean más proclives a desarrollar neoplasia que otras ha inducido a pensar en la existencia de una base genética en el desarrollo de la enfermedad (Barber 2004). Sin embargo, dentro de una misma especie esta hipótesis no se sustenta adecuadamente. El único dato relevante proporcionado en este sentido, se refiere a mayores prevalencias de neoplasia diseminada detectadas en dos líneas de ostra americana *Crassostrea virginica* producidas en laboratorio, con respecto a poblaciones salvajes de ostra (Frierman & Andrews 1976). Este hallazgo sugiere que estas ostras producidas en criadero presentaban una predisposición genética al desarrollo de neoplasia o que, debido probablemente al empleo de un número reducido de progenitores, se produjo una pérdida de heterocigosis que originó un aumento de la susceptibilidad a la enfermedad. La contribución potencial de este aspecto genético al desarrollo de la neoplasia es prácticamente ausente al tratar con poblaciones salvajes y sólo podría adquirir cierta consideración en especies cultivadas intensivamente a partir de semilla producida en criaderos (Barber 2004).

En el caso de cánceres de vertebrados, diferentes investigadores han buscado en células cancerosas secuencias de ADN que provoquen proliferación celular incontrolada cuando son introducidas en células normales (Cheng 1993). Parece que cambios en un número de genes relativamente pequeño pueden inducir la desregulación de la división celular de las células cancerosas (Klein 1987). Se cree que dos tipos de genes reguladores están implicados en este proceso: protooncogenes –que cuando sufren mutación codifican productos que ayudan a estimular la proliferación celular (denominándose entonces oncogenes)- y genes supresores de tumores –cuyos productos inhiben este proceso-. Según esto existen dos posibles rutas que conducen a una proliferación celular incontrolada: una primera que origina la estimulación de oncogenes, y una segunda que conduce a la inactivación de genes inhibidores. En el primer caso, que tiene un efecto dominante, la alteración sólo necesita afectar a un alelo. Se han detectado protooncogenes y genes supresores de tumores en muchas especies de vertebrados, y parece que estos también existen en invertebrados. Así, por ejemplo, ADN procedente de tumores gonadales de *Mya arenaria* y *Mercenaria* spp., transferido a líneas celulares NIN3T3, indujo tumores en ratones inyectados con estas células, indicando la presencia de genes transformados en las células tumorales (Van Beneden *et al.* 1993). Además proteínas mutantes codificadas por genes de la familia del gen

supresor de tumores p53 (responsable de la regulación del ciclo celular y que aparece mutado en un amplio espectro de cánceres humanos) han sido detectadas en células neoplásicas de *Mya arenaria* (Barker *et al.* 1997; Kelley *et al.* 2001) sugiriendo que alteraciones en este gen pueden estar implicadas en el desarrollo de neoplasia en moluscos bivalvos. La exposición a contaminantes genotóxicos puede inducir mutaciones en el ADN y dar lugar a células cancerígenas (Van Beneden *et al.* 1993; Dopp *et al.* 1996; Barker *et al.* 1997). Asimismo, además de los genes alterados, el sistema que controla la división celular puede verse alterado por ácidos nucleicos foráneos introducidos en la célula por virus. Estos virus se conocen como virus tumorales, y pueden ser de tipo ADN-virus o ARN-virus (Cheng 1993).

La relación entre virus, transformaciones carcinogénicas y supresión inmunológica en el desarrollo de neoplasias en moluscos bivalvos no ha podido ser claramente establecida por el momento (Elston *et al.* 1992). Sin embargo, actualmente, en cuanto a la etiología de la neoplasia, la hipótesis más aceptada es que ésta se deba a un agente infeccioso, cuya actividad (y desarrollo de la neoplasia resultante) puede resultar modificada por diferentes factores de estrés (Barber 2004).

Casos de neoplasia diseminada se han detectado en al menos 15 especies diferentes de bivalvos a nivel mundial (Peters 1988) y a veces han sido relacionados con eventos de mortalidades masivas de bivalvos comerciales (Elston *et al.* 1992). Las especies más afectadas, en las que dicha alteración alcanza niveles epizooticos, son almeja *Mya arenaria*, berberecho *Cerastoderma edule*, y mejillón *Mytilus trossulus*; las poblaciones de ostra *Crassostrea virginica* y *Ostrea edulis*, y de mejillón *Mytilus edulis* resultan también afectadas, pero en menor medida (revisión de Barber 2004). Para las poblaciones de *M. arenaria* y *C. edule* (revisadas por Barber 2004) la prevalencia de neoplasia diseminada fue consistentemente baja, pero pudiendo aumentar dramáticamente de una manera repentina originando mortalidades importantes con sustanciosas pérdidas económicas asociadas (Farley *et al.* 1986; Farley *et al.* 1991; McGladdery *et al.* 2001; Villalba *et al.* 2001).

Hasta 1997 en Galicia sólo se habían descrito casos de neoplasia diseminada en ostra *Ostrea edulis* cultivada en la Ría de Noia (Alderman *et al.* 1977), mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Gutiérrez & Sarasquete 1986; denominado como *M. edulis* en este artículo), almeja fina *Tapes decussatus* cultivada en la Ría de Arousa (Villalba *et al.* 1995) y en un único berberecho *Cerastoderma glaucum* recolectado en la Ría de Vigo (Rodríguez *et al.* 1997). La neoplasia alcanzó niveles epizooticos, y fue relacionada con

mortalidades importantes, únicamente en el caso de las ostras. Villalba *et al.* (2001) citan la presencia de dos importantes patologías afectando a varias poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* de las Rías Altas que sufrían elevadas mortalidades; se trataba del desarrollo de focos grandes de infiltración hemocitaria intensa y de neoplasia diseminada. Este mismo año se publica también la existencia de una posible neoplasia gonadal afectando a mejillones *Mytilus galloprovincialis* de la Ría de Vigo (Alonso *et al.* 2001).

#### **I.4. Trematodos digeneos que afectan a bivalvos marinos**

Los trematodos digeneos son parásitos del Filo Platelminetos. Los adultos de este grupo son gusanos aplanados dorso-ventralmente que, normalmente, parasitan a aves o peces, y que tienen fases de reproducción sexual y asexual. Los ciclos de vida son muy complejos, con fases larvarias que parasitan un mínimo de dos hospedadores, uno de los cuales es casi siempre un molusco. Se han descrito estados larvarios de trematodos digeneos prácticamente en todas las especies de bivalvos marinos, por lo que no es una exageración considerar a este grupo como el más importante de los metazoos parásitos que afectan a estos moluscos (Lauckner 1983).

Las diferentes especies de trematodos digeneos han sido descritas en base a la morfología de su cercaria, sin embargo existe una gran confusión y ausencia de conocimiento de los ciclos de vida de la mayoría de digeneos, de manera que la taxonomía está en continua revisión y es habitual que, dos formas consideradas especies diferentes, finalmente resulten ser diferentes fases del ciclo de una misma especie (Lauckner 1983). Stunkard (1940) asegura que “un mayor conocimiento de los ciclos de vida permitiría llevar a cabo métodos de regulación más efectivos e inteligentes, reducción de la morbilidad, promoción de la salud y conservación de los recursos naturales”. Asimismo, teniendo en cuenta la ubicuidad de los trematodos digeneos en las aguas costeras, un conocimiento apropiado de los ciclos de vida de los mismos debería considerarse un prerrequisito básico para lograr un entendimiento adecuado de la dinámica de poblaciones y ecología general en el medio ambiente marino (Anderson 1979; Sousa 1991).

Los bivalvos marinos actúan normalmente como hospedadores primarios (fase larvaria de esporoquiste y cercaria) o secundarios (fase larvaria de metacercaria) de los trematodos digeneos, aunque excepcionalmente pueden ser también hospedadores definitivos. Existen diferentes variedades de ciclos de vida en los que los bivalvos están

implicados (Tabla I.1); un ejemplo uno de ellos se representa de manera esquemática en la Figura I.1.

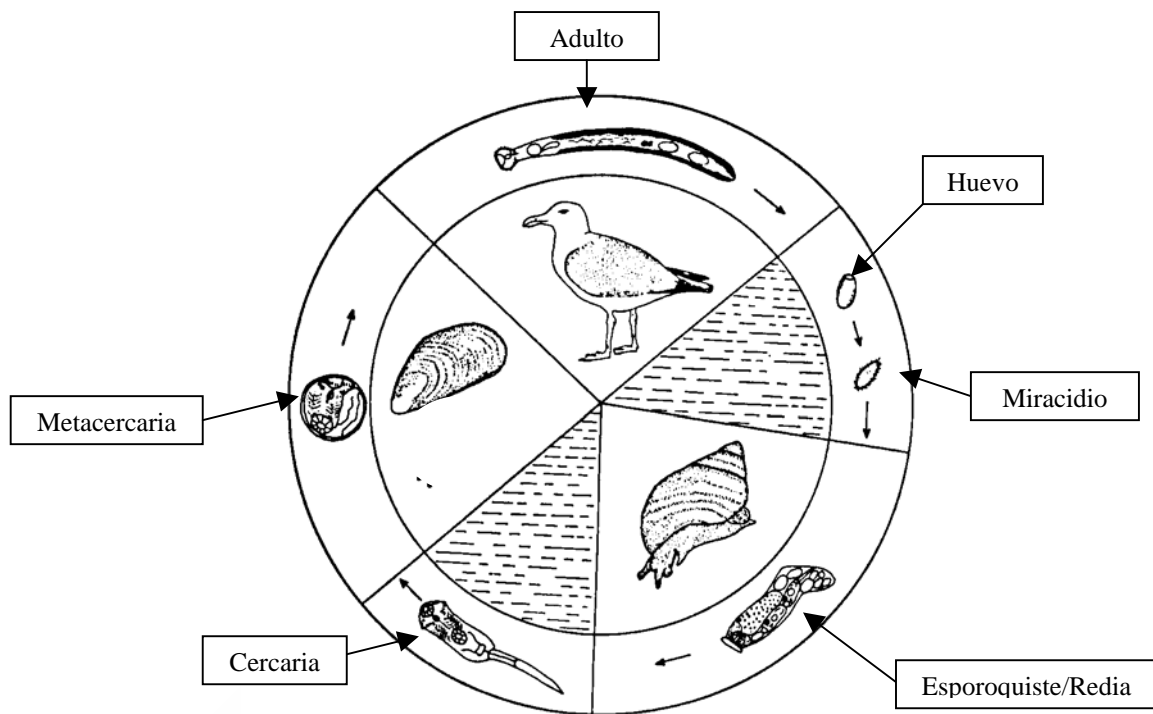
**Tabla I.1:** Esquema de los ciclos de vida de trematodos digeneos parásitos de moluscos bivalvos (adaptado de Lauckner 1983)

Hospedador primario	Hospedador secundario	Hospedador final	Familia Digenea
Bivalvo	Pez	Pez	Bucephalidae
Bivalvo	-	Pez	Sanguinicolidae
Bivalvo	Bivalvo	Pez	Monorchiidae
Bivalvo	Gasterópodo	Pez	
Bivalvo	(Bivalvo)*	Pez	
	Hospedador alternativo (no molusco)		
Gasterópodo	Bivalvo	Pez	
Gasterópodo	Bivalvo	Invertebrado	
Bivalvo	Bivalvo	Ave	Gymnophallidae
Bivalvo	(Bivalvo)*	Ave	
	Hospedador alternativo (no molusco)		
Gasterópodo	Bivalvo	Pez	Lepocreadiidae
Gasterópodo	Bivalvo	Pez	Zoogonidae
	Varios invertebrados		
Gasterópodo	Bivalvo	Ave	Psilostomatidae y Rencolidae
Gasterópodo	Bivalvo	Ave	Echinostomatidae
	Otros invertebrados		
Bivalvo	Bivalvo	Pez	Fellodistomidae
Bivalvo	Varios invertebrados	Pez	
Bivalvo	-	Pez	
Bivalvo	Bivalvo	Bivalvo (Pez)**	
	(Bivalvo)*	Bivalvo (Pez)**	

En negrita las familias y ciclos de vida de trematodos más habituales detectados en el berberecho *Cerastoderma edule*.

\* Cercaria libre que no emerge y se transforma en metacercaria dentro del hospedador intermediario primario (= ciclo de vida abreviado).

\*\* El unico ciclo de vida que incluye un bivalvo como hospedador final corresponde a *Proctoeces maculatus* –trematodo parásito de mejillón-, si bien se trata de un ciclo de vida alternativo que incluye a un pez como hospedador alternativo o como un hospedador post-ciclo.



**Figura I.1:** Ejemplo de ciclo de vida de trematodo digeneo de la familia Echinostomatidae cuyo hospedador intermediario primario es un gasterópodo, el secundario un bivalvo y el hospedador definitivo un ave marina. El círculo interior representa los hospedadores intermediarios (las rayas horizontales se refieren a momentos de vida libre en el medio marino) y el exterior las diferentes fases de desarrollo del ciclo de vida del trematodo. Adaptado de Lauckner (1980).

#### I.4.1. Bivalvos como primeros hospedadores intermediarios de Digenea

Mientras que los digeneos que parasitan gasterópodos lo pueden hacer en fase de esporoquiste, redia o ambas, el primer estado que afecta a bivalvos es la fase de esporoquiste. Los digeneos más importantes que emplean al berberecho como hospedador intermediario primario pertenecen a la familia Bucephalidae. Éstos son trematodos del suborden Gasterostomata y tienen ciclos de vida bastante uniformes, de manera que sus esporoquistes y cercarias ocurren siempre en bivalvos (siendo enormemente específicos con respecto a la elección de su primer hospedador intermediario), la metacercaria se enquista en varias partes del sistema nervioso central y periférico o en órganos internos y la musculatura de pequeños peces teleósteos; y los adultos habitan el tracto alimentario de peces depredadores. El conocimiento de los



ciclos de vida y ecología de la familia Bucephalidae es de gran importancia, ya que sus larvas afectan a numerosos invertebrados marinos de importancia económica comercial, tales como mejillones, berberechos y ostras; y peces planos y gadoideos. Las larvas de Bucephalidae son probablemente los parásitos metazoos más nocivos que afectan a bivalvos marinos. Sus esporoquistes causan castración y debilitamiento en el hospedador. La metacercaria de algunas especies de Gasterostomata puede invadir peces en un número suficiente para causar daño o hacer que éstos resulten incomedibles (Lauckner 1983).

#### **I.4.2. Bivalvos como segundos hospedadores intermediarios de Digenea**

Un gran número de trematodos digeneos desarrollan su fase de metacercaria en bivalvos marinos, de tal manera que funcionan como hospedadores intermediarios secundarios. Estos digeneos pertenecen a familias cuyo hospedador final son peces (Monorchidae, Lepocreadiidae y Zoogonidae), o aves (Echinostomatidae, Rencolidae, Psilostomatidae, con metacercarias enquistadas, y Gymnophallidae, con metacercarias desnudas). Las metacercarias normalmente no causan castración y han sido consideradas generalmente como causantes de poco o ningún daño en el hospedador. Sin embargo, existen evidencias de que pueden provocar, entre otros, los siguientes efectos (Lauckner 1983): debilitamiento general; deformidades en la concha; erosión química de la concha; producción de perlas y concreciones calcáreas; hipertrofia o atrofia de tejidos afectados; alteraciones en el comportamiento del hospedador, que favorecen la detección y depredación del mismo por el hospedador final; incrementos en el consumo de oxígeno y la tasa metabólica; cambios en la respuesta al estrés medioambiental; autotomía de partes del organismo (sifones); y finalmente, muerte del hospedador en caso de altas intensidades de infestación.

Existen referencias, además, de que larvas de Echinostomatidae, incluyendo las del género *Himasthla*, han estado implicadas en disturbios gastrointestinales en humanos debido al consumo de moluscos crudos (Lauckner 1983).

### **I.5. Interés de los estudios patológicos de moluscos bivalvos**

El desarrollo de una línea de investigación sobre las alteraciones patológicas que afectan a un grupo de organismos de interés comercial, y que busque obtener resultados útiles para la gestión de la explotación del recurso en una región, debe contemplar tres etapas (Villalba, informe interno Xunta de Galicia):

1. Una primera aproximación que permita identificar aquellas alteraciones patológicas causantes de problemas en la región. En el caso de las explotaciones de moluscos bivalvos, por problemas se puede entender pérdidas a nivel de supervivencia, crecimiento, calidad (condición, contenido en carne) o fecundidad (posible disminución en el reclutamiento natural).
2. Profundización en el estudio de las alteraciones patológicas detectadas potencialmente dañinas, con el fin de adquirir un nivel de conocimientos suficientes para abordar la siguiente etapa. Entre otros aspectos, los estudios epizootiológicos resultan fundamentales para la implementación de métodos para el control y la prevención de enfermedades en el ámbito de la maricultura (McVicar 1990).
3. Desarrollo de medidas de lucha para que los problemas patológicos se mitiguen o desaparezcan.

Entre las medidas de lucha, se distinguen dos estrategias fundamentales a la hora de abordar la gestión de los problemas patológicos:

- (i) Medidas dirigidas a evitar la aparición de los problemas patológicos en zonas libres de los mismos. En este aspecto el control de la expansión de las enfermedades está regulada por legislación de la Comisión Europea. La Directiva 91/67/ECC (Anónimo 1991), la 94/306/EC (Anónimo 1994) y legislación posterior complementaria y derivada, establecen una normativa común a los países de la Unión Europea que facilita el libre mercado y movimiento de moluscos, al tiempo que limita la expansión de enfermedades que podrían acarrear pérdidas a la industria (Cunningham 2002).



- (ii) Medidas de mitigación o erradicación de las alteraciones patológicas problemáticas de las zonas en que están presentes. Se incluyen en este grupo las siguientes: vacunación, tratamientos terapéuticos, cambios en las prácticas de cultivo/explotación y uso de variedades/especies resistentes.

En el caso de los moluscos bivalvos, debido a las características de su sistema inmunitario (carencia de memoria inmunológica) la vacunación es inviable. Además los tratamientos terapéuticos apenas tienen sentido cuando se trata de cultivos de bivalvos establecidos en el medio natural o bancos naturales. Por lo tanto los cambios en las prácticas de cultivo/explotación y, fundamentalmente, el uso de variedades/especies resistentes son las medidas aplicables. Las variedades resistentes tradicionalmente se han conseguido mediante técnicas de selección genética clásicas en la mejora animal (Haskin & Ford 1979, 1987; Ford & Haskin 1987; Martin *et al.* 1993; Barber *et al.* 1998; Davis & Barber 1999; Culloty *et al.* 2004). Esta selección, sin embargo, puede ser larga y tediosa, particularmente si la resistencia implica la expresión de varios genes. Además, la selección persistente de un rasgo puede originar una disminución en el rendimiento global (Roch 1999). Además de la selección genética de animales resistentes a las diferentes patologías se está avanzando en la caracterización de genes asociados al sistema inmune (Gueguen *et al.* 2003; Venier *et al.* 2003) con dos objetivos fundamentalmente (Roch 1999): 1) lograr su inducción tras la infección; y 2) implantación de estos genes en otras especies mediante técnicas de ingeniería genética para implementar su resistencia a la enfermedad. Esta última estrategia es muy controvertida pero constituye una tecnología muy prometedora que ya se está llevando a cabo en otros organismos y, en el caso de los bivalvos, se están sentando las bases para poder emplearla (Cadoret *et al.* 1997; Buchanan *et al.* 2001a, b).

En Galicia, los estudios patológicos realizados hasta el momento, se han centrado fundamentalmente en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) cultivado en batea (Gómez-Mourelle 1993; Villalba *et al.* 1993a, b; Robledo 1994; Robledo & Figueras 1995) – estudios encuadrados en las etapas 1 y 2 descritas anteriormente, no habiéndose abordado la etapa 3 ante la ausencia de amenazas patológicas reales para el cultivo del mismo–; almejas (*Tapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, *V. romboides* y *Tapes*

*philippinarum*) –siendo estudios de etapas 1 y 2 fundamentalmente (Figueras *et al.* 1992; Villalba *et al.* 1993c; López 1995; Villalba *et al.* 1999; Ordás *et al.* 2001; Casas 2001; Casas *et al.* 2002; Villalba *et al.* 2005)-; y ostra (*Ostrea edulis*) –habiéndose abordado ya estudios de etapas 1 y 2 (Montes *et al.* 1989; Montes 1990, 1991; Figueras 1991; Montes *et al.* 1991, 1994, 1995) y etapa 3 (Montes *et al.* 2003; da Silva 2005; da Silva *et al.* 2005a)-. Otros grupos con interés comercial, como berberechos y pectínidos, apenas habían sido objeto de atención en el momento en que se inició el proyecto en el que se encuadró la presente tesis doctoral. Con el desarrollo de la misma se abordan las etapas 1 y 2, previas al desarrollo de estrategias de lucha (etapa 3) contra los problemas patológicos que puedan afectar a las poblaciones de berberecho (*Cerastoderma edule*) de Galicia.



## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---





## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El berberecho es una especie cuyo ciclo vital se caracteriza por un tamaño de población muy variable y mortalidades muy elevadas. Estas mortalidades han sido relacionadas con variaciones impredecibles de las condiciones ambientales y otro tipo de factores, entre los que se incluyen interacciones ecológicas como depredación, competencia inter e intraespecífica y, probablemente, parasitismo (Kristensen 1958; Hancock & Urquhart 1965; Desprez *et al.* 1987; Ducrotoy *et al.* 1987). A pesar de la relevancia del berberecho como especie dominante en los bancos marisqueros gallegos sus poblaciones no han sido estudiadas en profundidad desde un punto de vista patológico. En los años 80 se realizaron varios estudios sobre dinámica de poblaciones y otros aspectos productivos de berberecho de la costa gallega (González & Pérez Camacho 1984a, b; Mejuto 1984a,b; Pereira *et al.* 1984; Pérez Camacho & Román 1984; García *et al.* 1987; López *et al.* 1987); en ellos se señala la conveniencia de abordar estudios patológicos que contribuyan a explicar las elevadas mortandades que experimenta esta especie. González Herrero *et al.* (1987) realizan la primera descripción histopatológica de *C. edule* en Galicia y citan la presencia de la gregarina *Nematopsis* sp., turbelarios, trematodos y copépodos, aunque sin indicar de qué especies se trata. Desde ese trabajo no se publica ningún estudio patológico hasta el año 1997, en que Rodríguez *et al.* describen un único caso de neoplasia diseminada en tejidos de un berberecho *C. glaucum* de la Ría de Vigo.

Con motivo de un episodio de elevadas mortalidades de berberecho *Cerastoderma edule* en poblaciones explotadas en las rías altas gallegas se realizó un informe que desveló la existencia de dos importantes patologías afectando a las mismas: enfermedad de los focos grandes de infiltración hemocitaria intensa y neoplasia diseminada (Villalba *et al.* 2001). Ambas condiciones originaban lesiones importantes en los tejidos del hospedador y, ante la imposibilidad de establecer una relación directa con la mortalidad, se inició un proyecto de investigación en el que se encuadra la presente tesis doctoral. El objetivo general de dicho proyecto era profundizar en el estudio de éstas y otras condiciones patológicas, y de sus efectos en las poblaciones naturales de berberecho sobre las que se sustenta gran parte del marisqueo en Galicia.

***Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron los siguientes:***

1. Identificar los parásitos y alteraciones patológicas que afectan a los principales bancos de berberecho *Cerastoderma edule* de la costa de Galicia, definiendo la distribución geográfica de los más patogénicos.
2. Caracterizar a nivel citológico e histológico las principales alteraciones patológicas detectadas afectando a berberecho (neoplasia diseminada, infestación por trematodos digeneos y desarrollo de focos grandes de infiltración hemocitaria intensa –en adelante FGIHI-). Además, en el caso de la neoplasia diseminada, poner a punto técnicas adecuadas para su diagnóstico.
3. Caracterizar la epizootiología de neoplasia diseminada, infestación por el trematodo *Labratrema minimus* y desarrollo de FGIHI en los aspectos siguientes: dinámica temporal, relación con variables ambientales (temperatura, salinidad, concentración de clorofila *a*) e influencia de la edad del berberecho en la susceptibilidad a estas enfermedades.
4. Evaluar el efecto de dichas alteraciones en el rendimiento en carne del berberecho.
5. Determinar el impacto de las enfermedades mencionadas en el potencial reproductor de *C. edule*, para lo que fue necesario previamente caracterizar histológicamente el ciclo gonadal de esta especie en las rías gallegas.

**III. PARÁSITOS Y ALTERACIONES  
PATOLÓGICAS DE LAS POBLACIONES DE  
BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA  
COSTA DE GALICIA**

---

UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA





### III. PARÁSITOS Y ALTERACIONES PATOLÓGICAS DE LAS POBLACIONES DE BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA

#### III.1. RESUMEN

Con objeto de identificar las patologías que afectan a las poblaciones de berberecho de los bancos gallegos económicamente más importantes, en el verano de 1999 se recogieron muestras de 30 berberechos adultos en 34 bancos naturales, que fueron procesadas mediante técnicas histológicas. Se detectó neoplasia diseminada en muestras de la mayor parte de los bancos estudiados, presentando algunos de ellos una alta prevalencia de la enfermedad. Los parásitos más prevalentes fueron la gregarina *Nematopsis* sp., estadios larvarios de trematodos, y quistes branquiales extracelulares de cierto tamaño que contenían en su interior organismos de naturaleza bacteriana. También se observaron con bastante frecuencia turbelarios *Paravortex cardii*, colonias intracelulares de organismos de tipo rickettsiano en epitelio digestivo y branquial, coccidios *Pseudoklossia* sp., ciliados *Trichodina* sp. y otros ciliados no identificados. En muestras de algunos bancos naturales –con una prevalencia menor– se detectaron también copépodos en branquias e intestino y gregarinas no identificadas en el epitelio intestinal y tejido conjuntivo circundante. En algunos bancos se diagnosticó el desarrollo de focos grandes de infiltración hemocitaria intensa. En berberechos de dos bancos se observaron quistes del microsporidio *Stenhausia* sp. y plasmodios y esporas de un haplosporidio. Con frecuencia se detectaron procesos inflamatorios en las muestras. Algunos de los parásitos y alteraciones patológicas podrían estar asociadas a mortalidad de berberecho.

#### SUMMARY

A survey of pathological conditions affecting cockle populations of the most economically important natural beds of Galician estuaries in NW Spain was performed. Samples of 30 adult cockles were collected from 34 natural beds in summer of 1999 and processed by histological techniques. Disseminated neoplasia was seen in samples from most natural beds, in some cases with a high prevalence. The gregarine *Nematopsis* sp., larval trematode stages, and branchial extracellular large cysts enclosing bacteria-like

microorganisms were the most prevalent parasites. Turbellarian *Paravortex cardii*, intracellular colonies of rickettsiae-like organisms in digestive and gill epithelia, coccidians *Pseudoklossia* sp., ciliates *Trichodina* sp., and other unidentified ciliates were frequently seen in the samples. Copepods in gills and intestine and unidentified gregarines in intestine epithelia and surrounding connective tissue were less prevalent and were observed in samples of some natural beds. Large foci of heavy hemocytic infiltration were detected in a few sites only. Cysts of the microsporidian *Stenhausia* sp. and plasmodia and spores of an haplosporidian were detected in cockles from two localities. Inflammation was frequently observed in the samples. Some of the parasites and pathological conditions could be associated with cockle mortality.

### III.2. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las poblaciones de berberecho de la costa gallega están compuestas por individuos de *Cerastoderma edule*, aunque existen áreas donde hay también poblaciones de *Cerastoderma glaucum*. Aunque el berberecho es una especie dominante en muchos bancos de moluscos bivalvos de Galicia y supone un recurso de importante valor económico, existen muy pocos estudios patológicos realizados sobre esta especie. Hasta el momento del inicio de este estudio solamente existía una cita acerca de la presencia de la gregarina *Nematopsis* sp., turbelarios, trematodos y copépodos, aunque sin indicar de qué especies se trataba (González Herrero *et al.* 1987) y había sido descrito un caso de neoplasia diseminada en *C. glaucum* de la Ría de Vigo (Rodríguez *et al.* 1997). En 1997 se detectaron altas mortalidades de berberecho en bancos intermareales de las Rías altas gallegas. Su estudio histológico reveló que éstos sufrían dos graves alteraciones patológicas: neoplasia diseminada y otra alteración caracterizada por la existencia de focos grandes de reacción hemocitaria intensa en diferentes órganos. Se observaron además células no identificadas en el interior de los hemocitos que integraban los focos. Se estableció la hipótesis de que podría tratarse de un parásito protista o bien de células dañadas del propio hospedador que habían sufrido fagocitosis (Villalba *et al.* 2001).

Se han descrito bacterias, organismos protistas y metazoos como parásitos de *C. edule* en otros países (Lauckner 1983; Bower *et al.* 1994). Brotes epizootiológicos de neoplasia diseminada han sido asociados a mortalidades masivas en poblaciones de *C.*

*edule* en Irlanda (Twomey & Mulcahy 1984, 1988a,b) y la Bretaña francesa (Poder & Auffret 1986).

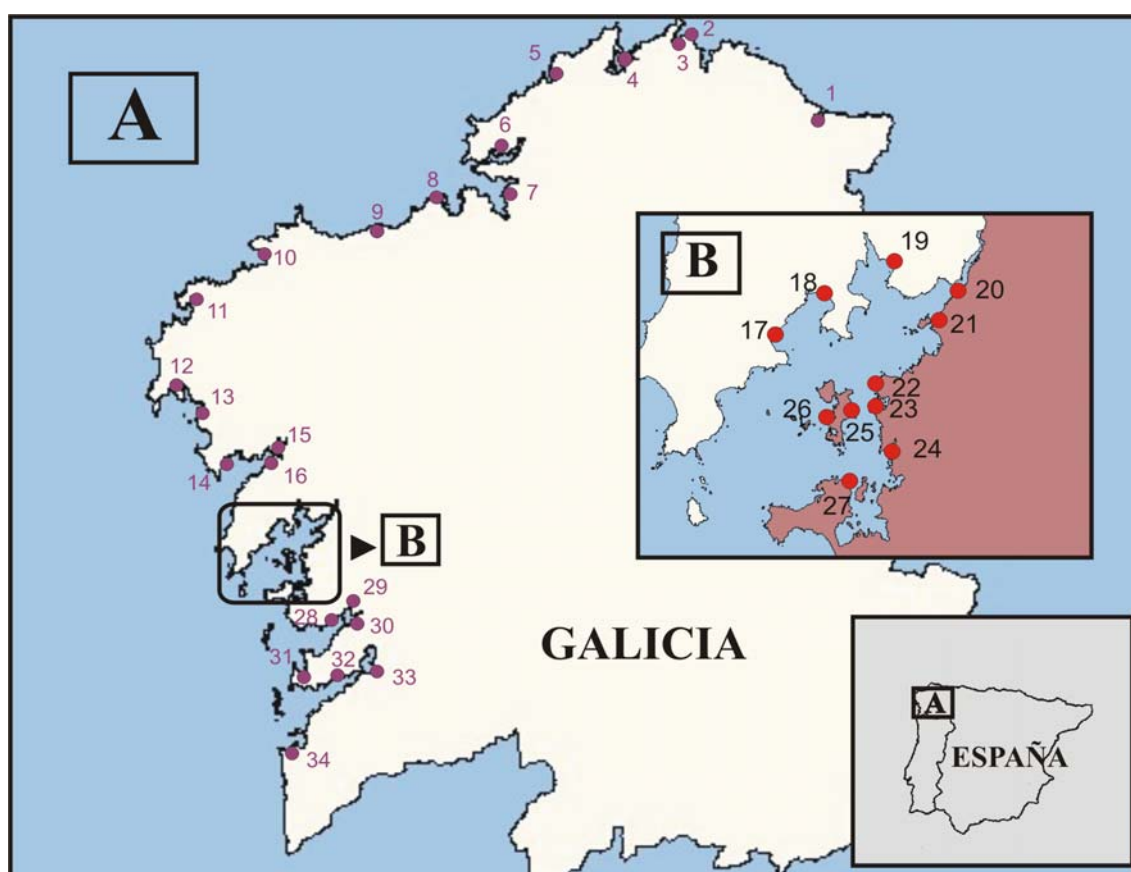
El objetivo de este estudio fue caracterizar los organismos parásitos y las alteraciones patológicas de los berberechos de los bancos naturales más importantes de Galicia.

### III.3. MATERIAL Y MÉTODOS

Entre junio y julio de 1999 se recogieron muestras de 30 individuos de talla comercial (longitud anteroposterior mayor de 28 mm) en cada uno de los 34 bancos naturales económicamente más importantes de Galicia (Figura III.1). A cada individuo se le extrajo una pieza de tejido (de aproximadamente 5 mm de espesor) que contenía masa visceral, pie, lóbulos del manto y branquia. Ésta se fijó en solución de Davidson (Shaw & Battle 1957) y fue incluida en parafina. Se realizaron cortes de 5  $\mu$ m de espesor que se desparafinaron y tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina (Howard & Smith 1983). Estos cortes histológicos fueron examinados al microscopio óptico con el fin de detectar la presencia de simbioses y alteraciones patológicas en los tejidos del berberecho.

Para cada banco muestreado se calculó el porcentaje de individuos que estaban afectados por cada parásito o alteración patológica (prevalencia). Con el fin de comparar los 34 bancos estudiados se procedió a calcular un índice de parasitación para cada banco. Así éstos fueron puntuados para cada simbiota y alteración patológica asignando valores de 1 (máxima prevalencia) a 34 (prevalencia más baja), calculándose a continuación la media de dicha puntuación para cada banco. Con este índice de parasitación los bancos fueron clasificados en tres grupos en función de si tenían altas (índice entre 10 y 14), medias (14 a 18) o bajas (18 a 22) prevalencias de las alteraciones/parásitos detectados.

En aquellos bancos en que el diagnóstico de la neoplasia diseminada fue negativo se recogieron de nuevo 30 individuos en el verano de 2000 y se procesaron histológicamente como se ha descrito, con el fin de confirmar estos enclaves como libres de neoplasia diseminada.



**Figura III.1:** Mapa de Galicia con la situación de los bancos de berberecho estudiados. 1: Foz, 2: Vicedo, 3: O Barqueiro, 4: Cabalar (Ortigueira), 5: Praia Madalena (Cedeira), 6: Barallobre (Ferrol), 7: Miño, 8: O Pasaxe, 9: Baldaio, 10: Anllóns, 11: Río da Ponte (Camarinas), 12: Praia de Cee (Corcubión), 13: Caldebarcos (Carnota), 14: Praia da Virxe (Muros), 15: San Cosme (Noia), 16: Misela (Noia), 17: Río Barbanza (A Pobra), 18: Barraña (Boiro), 19: Rianxo, 20: Lombos do Ulla, 21: Carril, 22: Vilaxoán, 23: Vilanova de Arousa, 24: O Sarrido (Cambados), 25: Camaxe (Illa de Arousa), 26: Espiñeira (Illa de Arousa), 27: As Vías (O Grove), 28: Combarro, 29: Campelo, 30: Placeres, 31: Aldán, 32: Moaña, 33: Redondela, 34: Baiona.

En cada una de las estaciones del año, se recogieron muestras de 30 berberechos en los bancos de Misela (Noia) y Camaxe (Illa de Arousa). A cada uno de estos individuos se le extrajo una de las láminas branquiales que fue incubada en caldo de tioglicolato para el diagnóstico de parásitos de tipo *Perkinsus* (Ray 1966). Además de entre estos 30 individuos se seleccionaron aleatoriamente 25 para su procesamiento histológico, siendo examinados mediante microscopía óptica para detectar la posible presencia de *Perkinsus* sp. Una de las preparaciones histológicas del banco de Praia da Virxe (Muros) parecía albergar un trofozoíto de *Perkinsus* sp. por lo que en Junio de 2000 –época determinada como de alta prevalencia de *Perkinsus atlanticus* en almeja (Casas 2002)- se recolectaron 50 berberechos que se procesaron en su totalidad

mediante la técnica de incubación de lámina branquial en tioglicolato. Además 30 de ellos fueron procesados también mediante técnicas histológicas con el fin de confirmar si dicho banco estaba afectado por este protozoo.

### **III.4. RESULTADOS**

El examen de las preparaciones histológicas reveló la presencia de organismos de naturaleza bacteriana, parásitos protistas y metazoos, casos de neoplasia diseminada y reacciones hemocitarias en algunos de los berberechos estudiados (Tabla III.1).

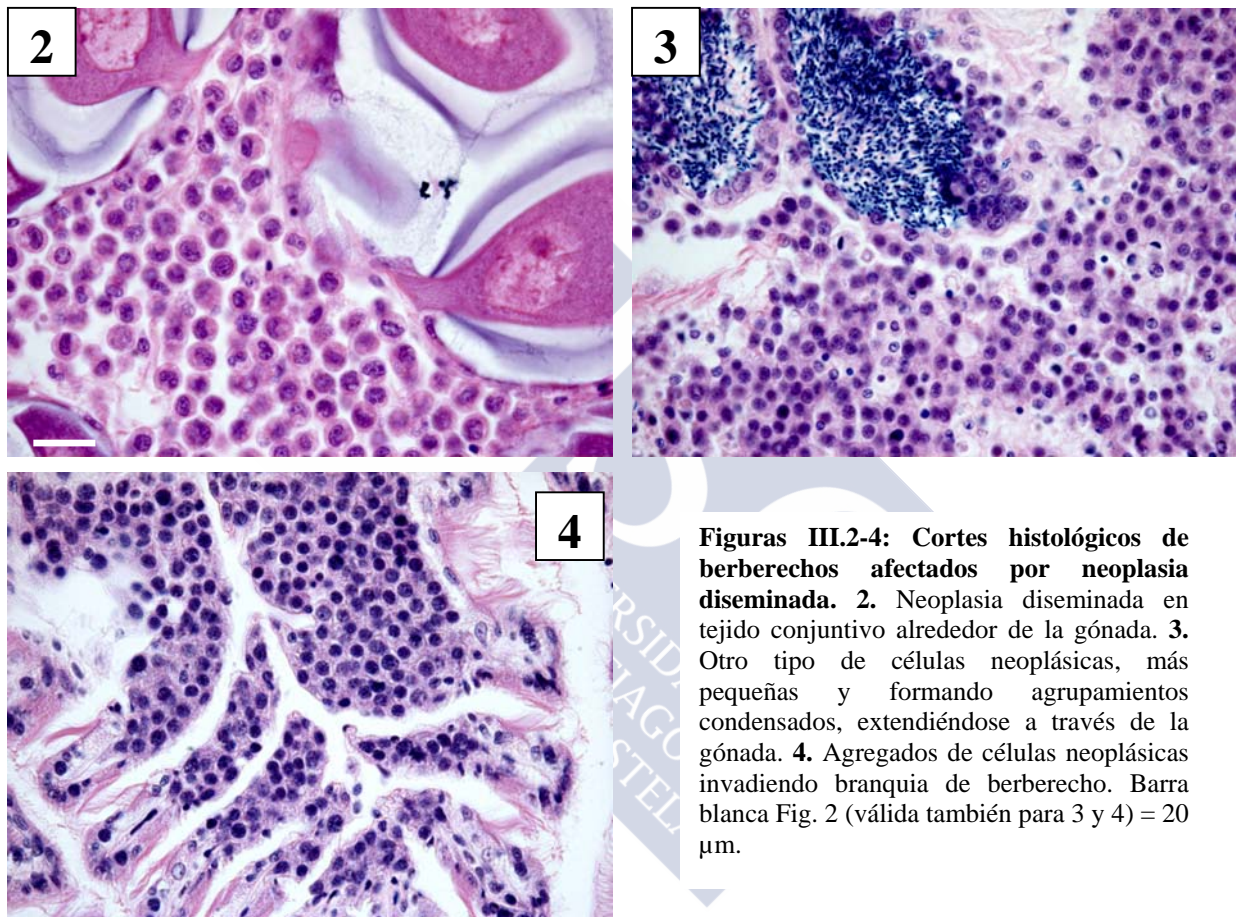
#### **III.4.1. Neoplasia**

Se detectó la existencia de neoplasia diseminada en 29 de los bancos estudiados, con una prevalencia media del 12 %. En 6 de los bancos la prevalencia de la neoplasia diseminada fue mayor del 20 %. Los valores más altos se detectaron en Misela (32 %), Redondela (28 %) y Cabalar (27%). Las células neoplásicas se caracterizaron por su gran tamaño ( $8,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ : media  $\pm$  EE,  $n=25$ ) y por poseer un núcleo enorme ( $6,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$  en diámetro) que ocupaba la mayor parte de la célula y que presentaba forma redondeada o lobulada con un nucleolo muy prominente y cromatina en motas. Normalmente el núcleo era excéntrico, pero no siempre. En casos de neoplasia muy intensa las células eran mayores y algunas tenían tres o más núcleos. Se observaron abundantes figuras mitóticas en estos casos. Los estados iniciales de la enfermedad se manifestaban con la aparición de algunas células anormales en el tejido conjuntivo alrededor de la gónada y la glándula digestiva. En estados más avanzados la mayoría de los órganos estaban afectados produciéndose un reemplazamiento de las células normales por neoplásicas (Figura III.2). Se observaron también células neoplásicas en vasos y senos de la hemolinfa.

Se observó también otro tipo de células neoplásicas en algunos berberechos. Estas células eran más pequeñas ( $7,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de diámetro,  $n=25$ ) y tenían núcleo redondo u ovalado, que era más pequeño que el del tipo ya descrito ( $5,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de diámetro). El núcleo también tenía un solo nucleolo. Estas células estaban agrupadas de manera muy condensada y colonizaban el tejido conjuntivo de la mayoría de los órganos, mayoritariamente alrededor de la gónada y branquias (Figura III.3). Por otro lado se observaron células neoplásicas y figuras mitóticas en epitelio branquial de ocho

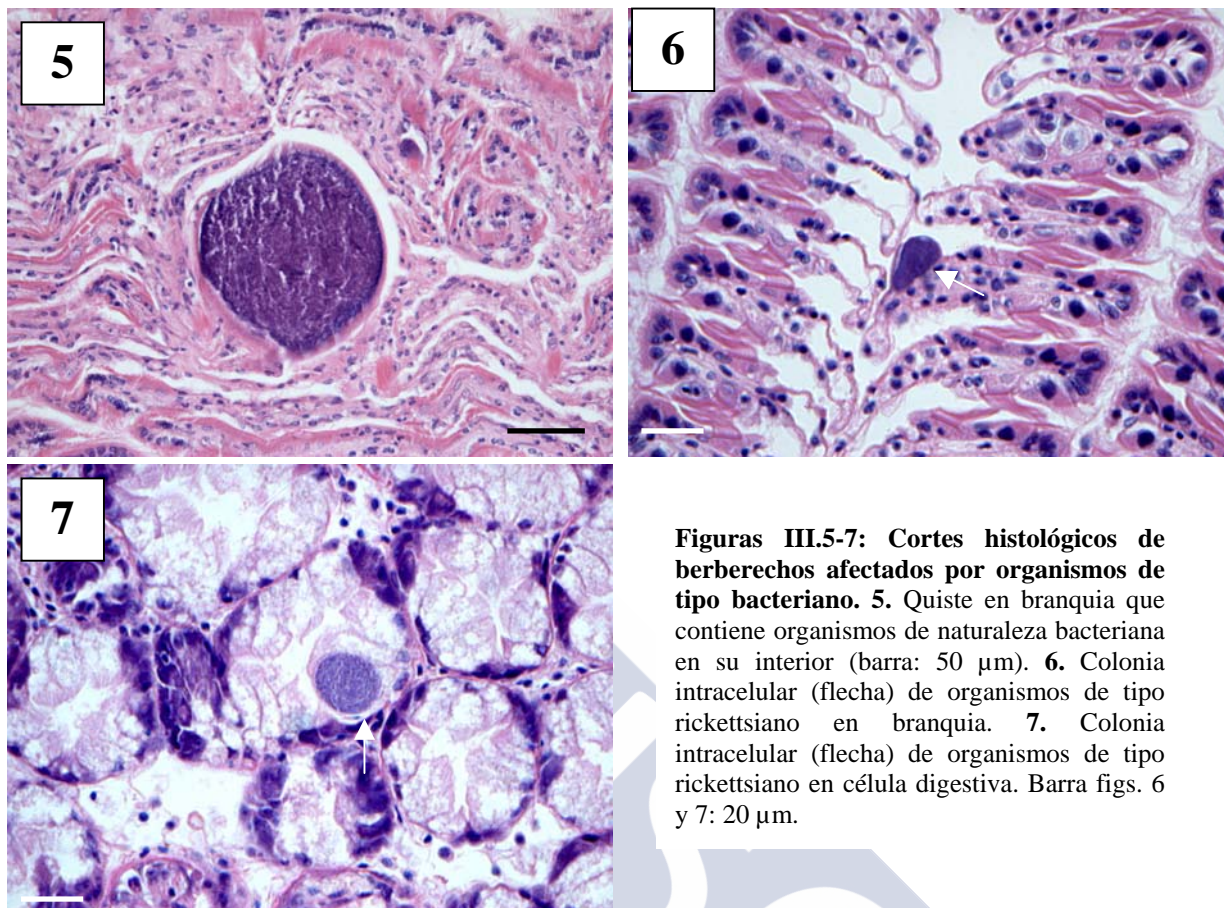


berberechos correspondientes a 5 bancos diferentes (Figura III.4). Cinco de estos berberechos tenían además neoplasia diseminada en el tejido conjuntivo de la glándula digestiva y de la gónada. Se detectó también un caso de invasión de los folículos gonadales por células neoplásicas. Algunos berberechos tenían una respuesta hemocitaria que consistía en pequeños pero numerosos focos hemocitarios en el interior de los cuales se observaban células neoplásicas. La neoplasia diseminada se tratará con más detalle en los capítulos IV y V de esta memoria.



#### III.4.2. Organismos de tipo bacteriano

Se observaron quistes extracelulares relativamente grandes (de 73 a 107  $\mu$ m de longitud, n=10) rodeados por una cubierta fibrosa eosinófila en branquia y más raramente en tejido conjuntivo del manto. Dichos quistes encerraban en su interior organismos basófilos de naturaleza bacteriana (2 y 4  $\mu$ m de longitud) (Figura III.5). Estos quistes fueron detectados en 31 bancos y con una prevalencia media del 41 %. No se observó reacción inflamatoria, pero los berberechos que presentaban un número alto de quistes tenían alterada la arquitectura branquial.



**Figuras III.5-7: Cortes histológicos de herbívoros afectados por organismos de tipo bacteriano. 5.** Quiste en branquia que contiene organismos de naturaleza bacteriana en su interior (barra: 50  $\mu$ m). **6.** Colonia intracelular (flecha) de organismos de tipo rickettsiano en branquia. **7.** Colonia intracelular (flecha) de organismos de tipo rickettsiano en célula digestiva. Barra figs. 6 y 7: 20  $\mu$ m.

Se detectaron colonias basófilas redondeadas e intracelulares constituidas por organismos de tipo rickettsiano en células de las branquias (Figura III.6), en 20 bancos naturales y con una prevalencia media del 13 %, y más frecuentemente en células digestivas (Figura III.7), en 26 bancos con una prevalencia media del 15 %. En las células digestivas, los focos bacterianos estaban localizados mayoritariamente en los túbulos digestivos y con menor frecuencia en los conductos secundarios. El tamaño de las colonias intracelulares oscilaba entre 14 y 20  $\mu$ m (n=10) en los túbulos digestivos y entre 13 y 22  $\mu$ m (n=10) en las branquias. La talla individual de los organismos de tipo rickettsiano era menor que la de los de naturaleza bacteriana observados en los quistes branquiales extracelulares. La intensidad de infección de los organismos de tipo rickettsiano en branquia y túbulos digestivos fue baja (10 colonias o menos por sección histológica). Con frecuencia sólo se observaba una colonia en cada túbulo digestivo pero en algún caso se contabilizaron hasta 4 colonias. No se detectó ninguna respuesta defensiva obvia a estos parásitos. La aparición simultánea de colonias intracelulares de tipo rickettsiano en branquia y digestivo fue detectada en 8 individuos.



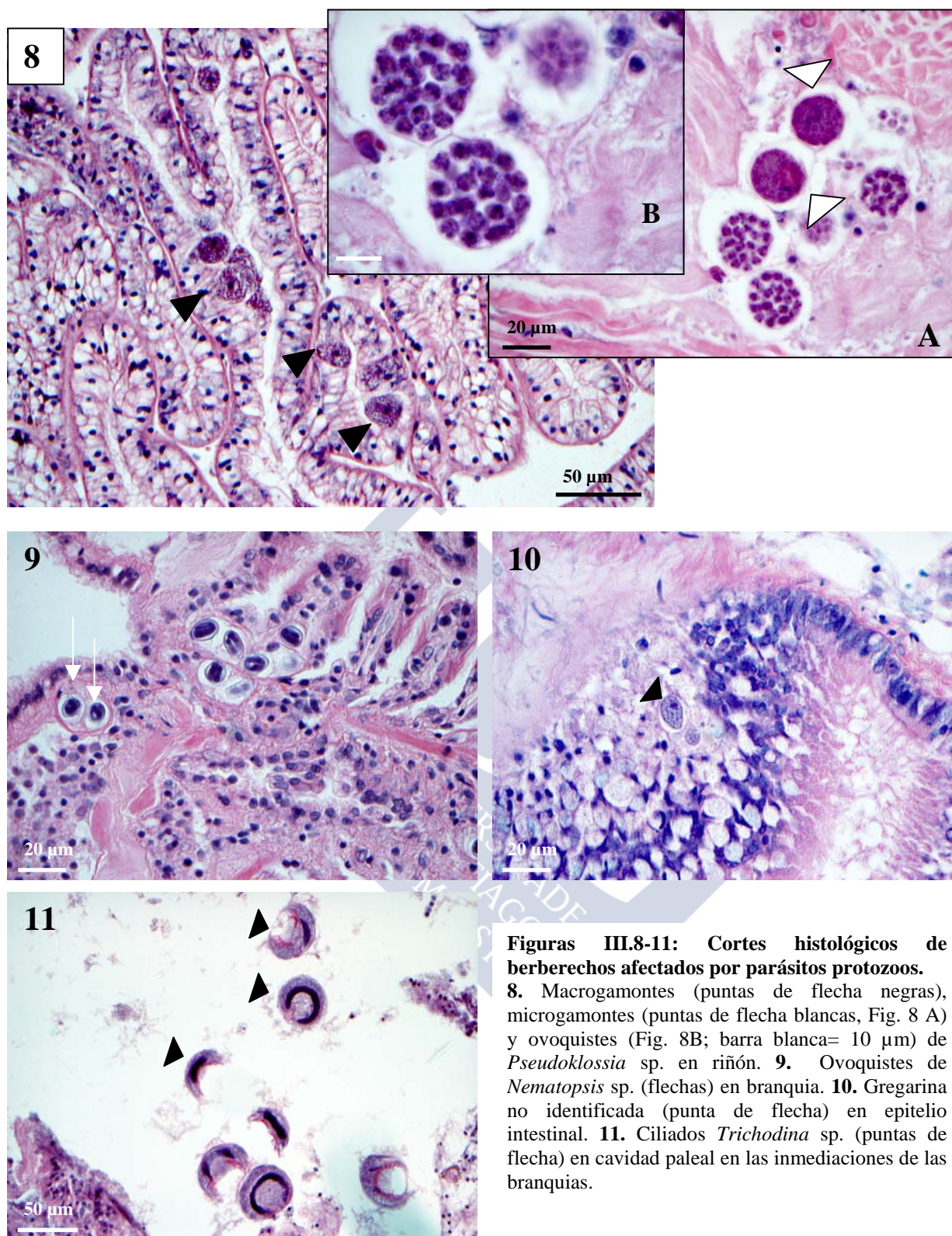
### III.4.3. Protozoos

Se localizó un coccidio del género *Pseudoklossia* en riñón en 16 localidades con una prevalencia media del 12 %. El riñón no fue sistemáticamente incluido en los tejidos procesados en algunos bancos, de manera que la prevalencia en los mismos no fue calculada (Tabla III.1). Se observaron diferentes estados del ciclo de vida de este coccidio (macrogamontes, microgamontes, ovoquistes, esporoquistes y esporozoitos) en los túbulos del riñón (Figura III.8). Los macrogamontes tenían forma redondeada (alrededor de 16  $\mu\text{m}$  de diámetro) con un citoplasma refringente que contenía un gran núcleo y nucleolo. Estos macrogamontes fueron localizados en el interior de células de los túbulos renales, algunos de ellos fijados al epitelio del túbulo por un pedúnculo, mientras que otros estaban libres en el lumen renal. Los microgamontes también tenían forma redondeada (alrededor de 12  $\mu\text{m}$  de diámetro) con un citoplasma refringente y numerosos microgametos. Éstos fueron observados en el lumen del riñón. Los ovoquistes (sobre 26  $\mu\text{m}$  en diámetro) que albergan esporoquistes (aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de diámetro), cada uno conteniendo dos esporozoitos (Figura III.8), aparecían libres en el lumen de los túbulos del riñón.

Las infecciones de *Pseudoklossia* sp. inducían lesiones ligeras o moderadas en los berberechos. Las células renales infectadas estaban hipertrofiadas. El riñón de algunos berberechos afectados mostraba una reacción hemocitaria local en el epitelio de los túbulos infectados y el tejido circundante. En infecciones severas, las células infectadas estaban fragmentadas y los gamontes y ovoquistes estaban libres, ocluyendo el lumen de los túbulos renales.

El único protozoo detectado en todos los bancos estudiados fue *Nematopsis* sp. Ovoquistes intrahemocitarios de esta gregarina (de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud y de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de ancho; n=10) fueron observados en tejido conjuntivo de la masa visceral, branquia y manto (Figura III.9 ) con una prevalencia media del 76%. Dos ovoquistes por hemocito fue la observación más común pero se llegaron a detectar hasta cuatro ovoquistes por hemocito. Esta gregarina indujo ligeras respuestas hemocitarias muy localizadas. Generalmente había pocos ovoquistes de *Nematopsis* sp. por individuo. Sin embargo, algunos berberechos tenían más ovoquistes, que inducían lesiones, de ligeras a moderadas, mayoritariamente en los filamentos branquiales.





**Figuras III.8-11: Cortes histológicos de berberechos afectados por parásitos protozoos.**

**8.** Macrogamontes (puntas de flecha negras), microgamontes (puntas de flecha blancas, Fig. 8 A) y ovoquistes (Fig. 8B; barra blanca= 10 µm) de *Pseudoklossia* sp. en riñón. **9.** Ovoquistes de *Nematopsis* sp. (flechas) en branquia. **10.** Gregarina no identificada (punta de flecha) en epitelio intestinal. **11.** Ciliados *Trichodina* sp. (puntas de flecha) en cavidad paleal en las inmediaciones de las branquias.

**Tabla III.1 (Página siguiente):** Prevalencia media (%) de parásitos y alteraciones patológicas de berberechos de Galicia. Localidades con índice parasitario alto (\*\*\*), medio (\*\*) y bajo (\*). Debido a que el riñón no resultó incluido de manera sistemática en los tejidos procesados de todos los bancos, no fue posible el cálculo de la prevalencia de *Pseudoklossia* sp. en la totalidad de los mismos. En aquellos en que no pudo ser calculada la prevalencia de dicho parásito se indica únicamente si fue detectado (Det.) o no (-) en los cortes histológicos estudiados.

Banco natural	Neoplasia		Trematodos		<i>Nematopsis</i> sp.	Quistes bacterianos		Rickettias en digestivo	Rickettias en branquias	<i>Paravortex cardii</i>	Gregarina indeterminada	<i>Pseudoklossia</i> sp	FGIH	Copéodos en branquia	Copéodos en intestino	Ciliados	Índice de parasitación
	diseminada																
1 Foz	0	70	100	0	0	17	0	17	0	20	0	0	3	0	0	13	16.5**
2 Vicedo	3	33	87	7	7	63	7	63	7	30	43	10	0	0	0	13	13.7***
3 O Barqueiro	15	41	100	22	22	11	0	11	0	0	7	-	39	0	0	15	14.6**
4 Cabalar (Ortigueira)	27	53	90	23	23	17	33	17	33	23	23	13	0	3	0	10	10.7***
5 Praia Madalena (Cedeira)	3	53	90	37	37	13	13	13	13	7	53	20	0	0	0	7	15.6**
6 Barallobre (Ferrol)	7	47	100	47	47	13	17	13	17	13	0	0	3	10	0	7	12.8***
7 Miño	7	13	60	20	20	23	3	23	3	23	27	23	0	13	0	20	15.1**
8 O Pasaxe	10	20	87	50	50	13	13	13	13	20	0	7	10	0	0	30	13.9***
9 Baldaio	0	33	97	0	13	17	0	17	0	13	3	3	0	0	0	7	19.6**
10 Anlóns	7	70	87	10	10	33	3	33	3	13	0	7	0	0	0	0	18.4*
11 Río da Ponte (Camarináas)	20	13	38	72	72	10	0	10	0	3	3	-	0	0	0	55	18.5*
12 Praia de Cee (Corcubión)	23	17	83	67	67	20	0	20	0	33	30	33	0	0	0	10	12.1***
13 Caldebarcos (Carnota)	0	40	100	0	0	30	0	30	0	13	7	0	0	0	0	0	19.4*
14 Praia da Virxe (Muros)	7	27	87	93	93	10	20	10	20	13	10	0	0	0	0	7	15.7***
15 San Cosme (Noia)	10	23	90	87	87	7	3	7	3	30	3	3	0	0	0	10	15**
16 Misela (Noia)	32	30	70	40	40	13	3	13	3	17	10	4	0	0	7	10	12.3***
17 Río Barbanza (A Pobra)	10	3	39	29	29	6	0	6	0	13	0	Det.	3	3	0	4	20.9*
18 Barraña (Boiro)	7	38	76	7	7	3	38	3	38	3	0	-	0	0	0	38	18.9*
19 Rianxo	7	10	82	22	22	10	0	10	0	0	0	-	0	10	3	9	19.6*
20 Lombos do Ulla	13	3	77	93	93	7	0	7	0	14	0	0	32	10	0	3	17**
21 Carril	0	3	37	7	7	10	0	10	0	0	3	-	3	11	0	7	20.7*
22 (Borreiros) Vilaxoán	7	0	36	33	33	0	4	0	4	10	0	-	0	25	3	11	17.5**
23 Vilanova de Arousa	0	30	87	3	3	0	7	0	7	3	0	-	0	7	0	3	22*
24 O Sarrido (Cambados)	20	30	71	37	37	3	0	3	0	57	0	-	0	0	0	13	17.7**
25 Canaxe (Illa de Arousa)	10	30	80	7	7	17	0	17	0	17	0	3	17	0	0	6	18.2*
26 Espiñeira (Illa de Arousa)	7	30	100	87	87	7	23	7	23	23	0	3	0	3	0	3	15.1**
27 As Vías (O Grove)	13	20	100	73	73	7	43	7	43	23	3	23	0	0	0	13	13.3***
28 Combarro	17	14	72	24	24	0	3	0	3	7	0	-	0	7	0	3	20.9*
29 Campelo	3	20	73	57	57	0	10	0	10	3	10	Det.	0	7	0	20	17.8**
30 Placeres	7	40	30	27	27	0	3	0	3	0	20	-	0	7	0	17	18.5*
31 Aldán	13	23	70	37	37	0	3	0	3	0	0	0	0	3	0	3	18*
32 Moaña	7	20	60	63	63	0	0	0	0	27	0	Det.	0	3	0	7	20*
33 Redondela	28	24	79	45	45	0	3	0	3	10	0	-	0	10	0	7	17.6**
34 Baiona	10	50	40	59	59	3	0	3	0	20	0	-	0	0	0	3	19.8*

Otra gregarina indeterminada, de 9 a 13  $\mu\text{m}$  en longitud y de 6 a 7  $\mu\text{m}$  de anchura, se detectó en el epitelio intestinal, músculos intestinales y el tejido conjuntivo circundante (Figura III.10). Esta gregarina presentó una prevalencia menor que *Nematopsis* sp. (16 bancos, 16% de prevalencia media). Se observaron respuestas inflamatorias locales asociadas con infecciones de estas gregarinas en el tejido conjuntivo.

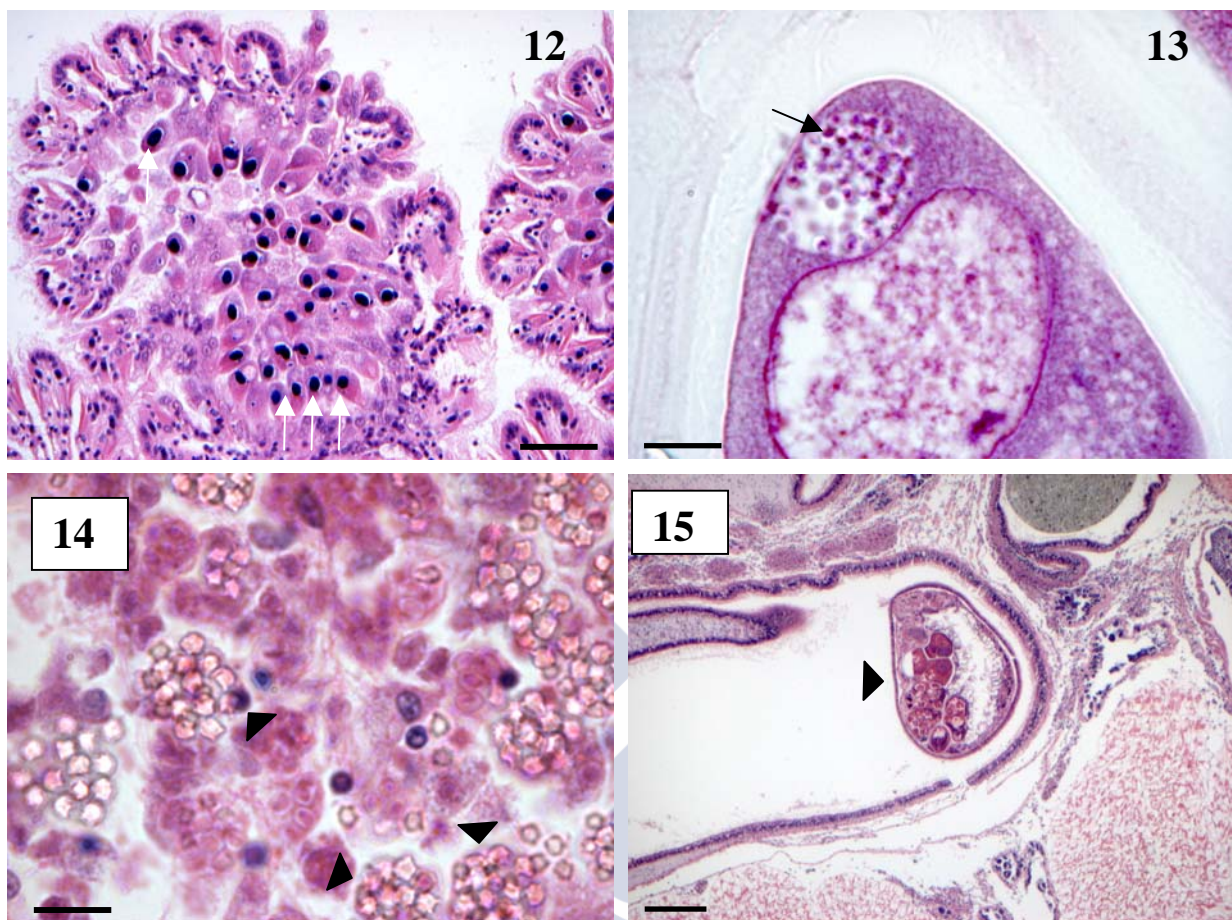
En todos los bancos excepto dos (Tabla III.1), se detectaron ciliados en cavidad paleal y branquia con una prevalencia media del 12%. Aunque la prevalencia fue alta en dos bancos (Barraña 38% y Río da Ponte 55%), el número de ciliados por corte histológico fue bajo. Los ciliados observados en berberecho fueron individuos de *Trichodina* sp., de 37 a 45  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura III.11), y ciliados tipo *Rynchodida*, de 18 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura III.12). Estos ciliados no causaron ningún daño patológico significativo y no indujeron ninguna respuesta hemocitaria.

En ovocitos de berberechos de dos localidades (Camaxe y Cee) se detectaron quistes, de aproximadamente 18  $\mu\text{m}$  de longitud, con esporas de microsporidio tipo *Stenhausia* (Figura III.13), de alrededor de 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Sólo un berberecho estaba afectado en cada banco y muy pocos ovocitos estaban infectados, sin producirse además daño patológico apreciable.

En berberechos de dos bancos (Camaxe y Vicedo) se localizaron también plasmodios de entre 5 y 6  $\mu\text{m}$  de diámetro y esporontes y esporoquistes de 11 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro que contenían esporas de 4  $\mu\text{m}$  de longitud de un haplosporidio no identificado (Figura III.14). En Camaxe sólo se localizó un berberecho infectado, mientras que en Vicedo fueron dos los berberechos afectados. El haplosporidio invadía el tejido conjuntivo de glándula digestiva, branquias, gónada y manto de dichos berberechos afectados. Las infecciones fueron de mayor intensidad en la glándula digestiva que en el resto de órganos e indujeron respuesta hemocitaria, que fue mayor cuando el estado plasmodial era dominante.

Pese a que, tal y como se comentó ya en el apartado de material y métodos, una de las preparaciones histológicas de uno de los bancos parecía albergar un trofozoito de *Perkinsus* sp., en el análisis de todos los cortes histológicos realizados en este estudio y de las branquias incubadas en tioglicolato no se detectó la presencia de organismos de tipo *Perkinsus* en ninguno de los bancos estudiados.





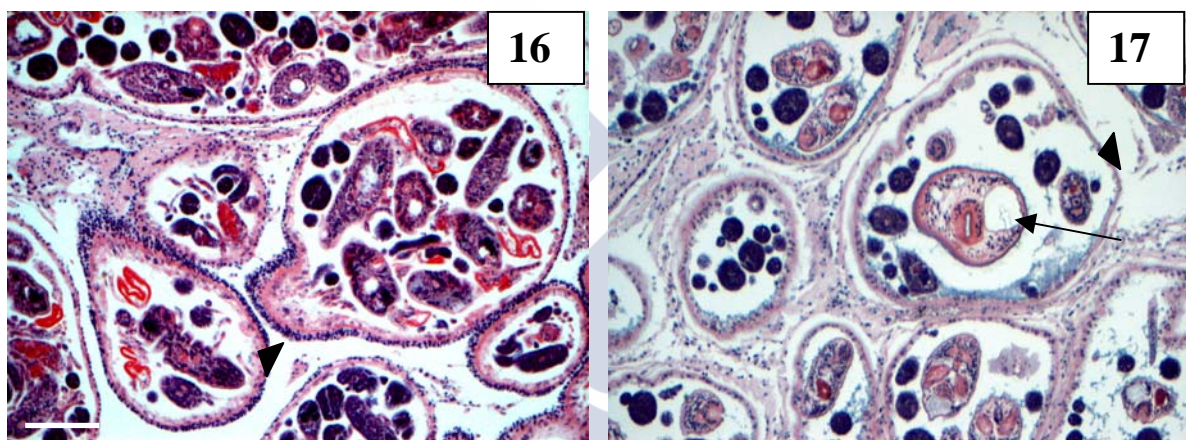
**Figuras III.12-15: Cortes histológicos de berberechos afectados por diferentes organismos simbiotes.** **12.** Ciliados tipo *Rynchodida* fijados a filamentos branquiales (flechas). Barra: 50  $\mu$ m. **13.** Esporoblastos de un microsporidio tipo *Stenhausia* (flecha) en un ovocito. Barra: 10  $\mu$ m. **14.** Esporoquistes que contienen esporas (puntas de flecha) de un haplosporidio no identificado en tejido conjuntivo de glándula digestiva y gónada. Barra: 10  $\mu$ m. **15.** *Paravortex cardii* (punta de flecha) en lumen intestinal. Barra: 200  $\mu$ m.

#### III.4.4. Metazoos

En 29 bancos naturales se observaron organismos turbelarios *Paravortex cardii* con una prevalencia media del 17 %, y a veces mucho mayor (Tabla III.1). Estos platelmintos se localizaban en el lumen intestinal (Figura III.15). Normalmente se observaban uno o dos individuos por corte histológico. No se observaron en ningún caso alteraciones en el hospedador ni respuesta hemocitaria.

Se observaron diferentes fases larvarias de trematodos digeneos en todos los bancos estudiados excepto en Vilaxoán. La prevalencia media fue del 29 % alcanzando prevalencias del 50 % y mayores en 5 bancos (Tabla III.1). Normalmente un incremento en la prevalencia en una localidad determinada estaba asociado también con un

incremento en la intensidad de infestación. Se observaron esporoquistes, que, en general, contenían en su interior cercarias en desarrollo (Figura III.16). De forma extraordinaria se detectaron en un berberecho de Foz esporoquistes que albergaban en su interior cercarias y metacercarias (Figura III.17). Los esporoquistes afectaban mayoritariamente a la gónada, pero también a la glándula digestiva, pie, riñón, branquias y manto. Los berberechos afectados por esporoquistes mostraron generalmente una intensidad alta de infestación. Los tejidos de la gónada y glándula digestiva se encontraban reemplazados por esporoquistes y cercarias, causando graves daños y castración en el hospedador.

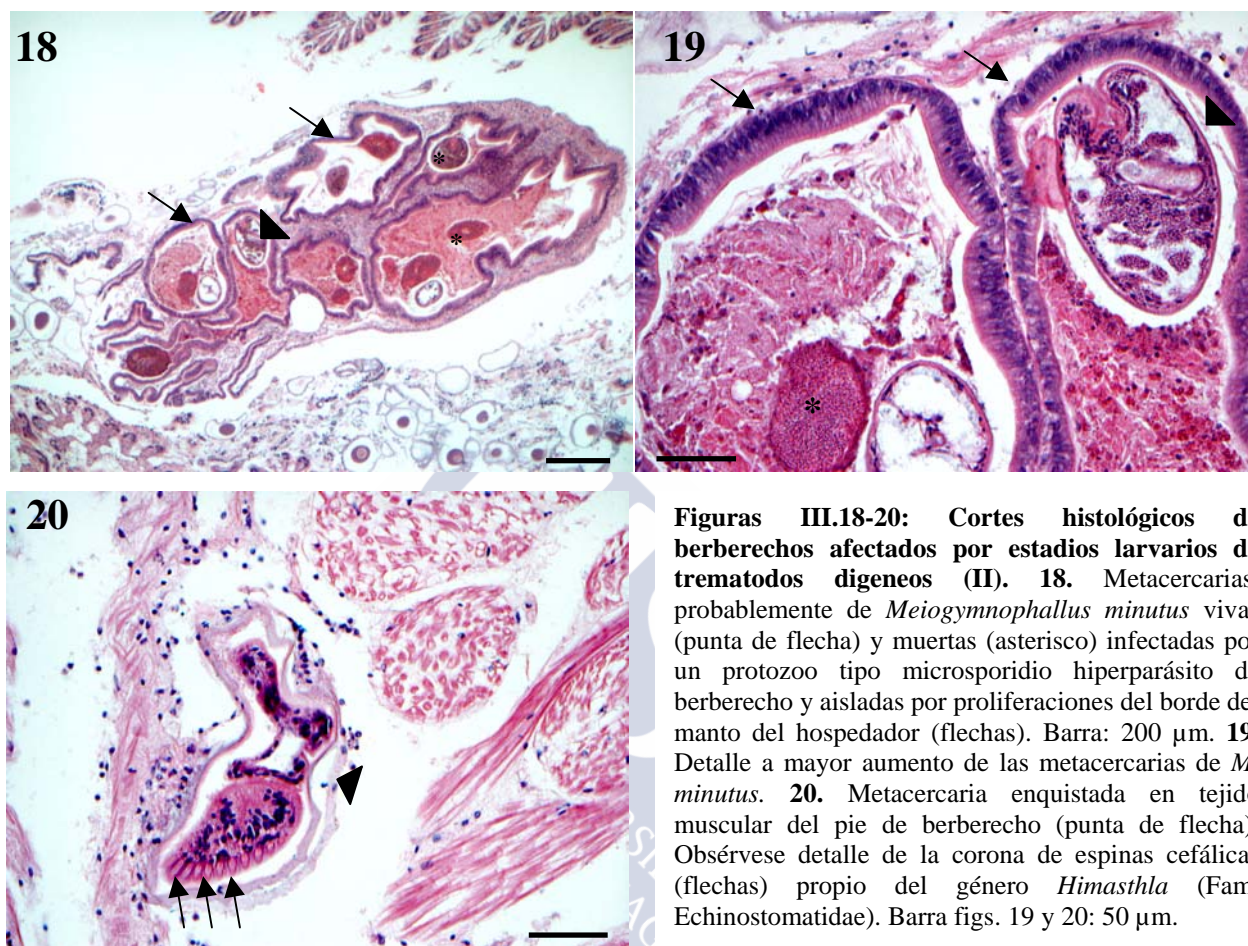


**Figuras III.16-17: Cortes histológicos de berberechos afectados por estadios larvarios de trematodos digeneos (I).** 16. Esporoquistes (punta de flecha) albergando cercarias en su interior probablemente de *Labratrema minimus* (Fam. Bucephalidae). Barra (válida también para 17): 100  $\mu$ m. 17. Esporoquistes (punta de flecha) que contienen cercarias y metacercarias (flecha).

Un tipo de metacercarias de trematodos (Figura III.18), que habitualmente estaban hiperparasitadas por un protozoo no identificado (Figura III.19), se localizaron en borde del manto envueltas por proliferaciones del epitelio extrapalial. Normalmente el número de metacercarias era bajo y no se detectaba ningún daño apreciable en el hospedador. Sin embargo en algún caso el número de metacercarias era tan elevado que el borde del manto aparecía hipertrofiado y mostrando numerosos pliegues epiteliales. Se observó también otro tipo de metacercarias que aparecían normalmente enquistadas en el pie (Figura III.20) y, con menor frecuencia, en el manto, en zonas próximas a la gónada y a la glándula digestiva, y en los palpos labiales. Fue habitual también, observar granulocitomas que englobaban estas metacercarias. En algún caso estos granulocitomas eran de un tamaño considerable.

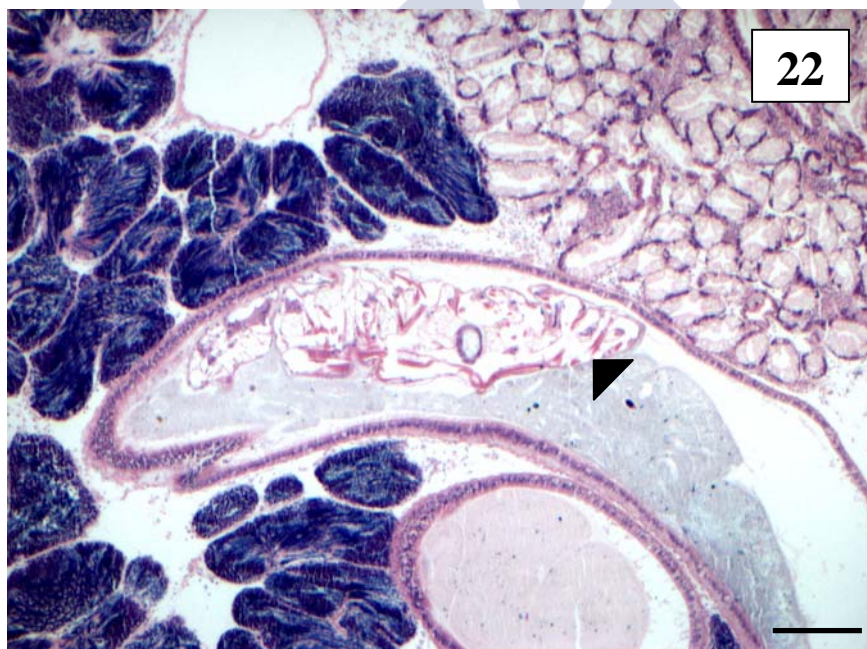
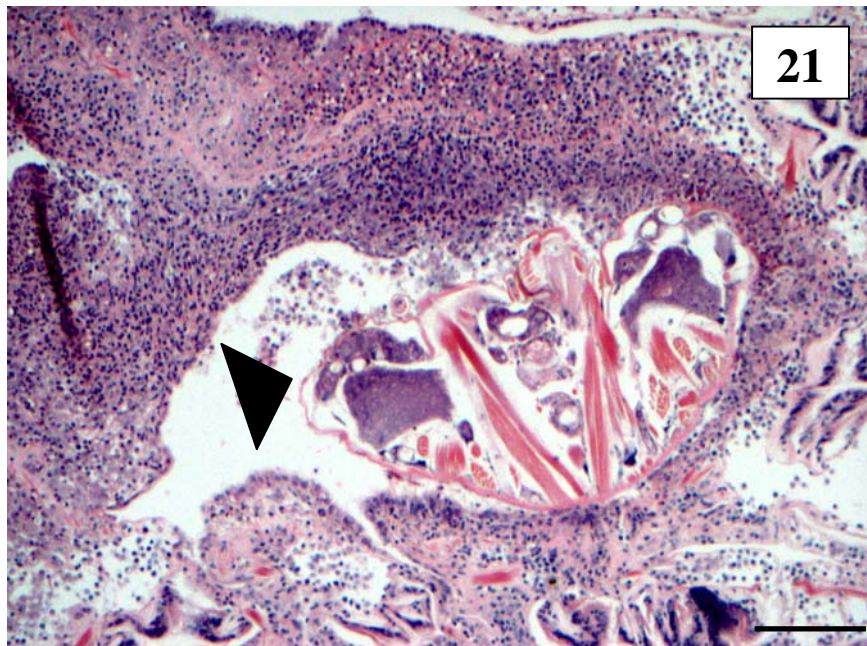


Algunos berberechos estaban parasitados simultáneamente por metacercarias de distintos tipos y esporoquistes en la gónada y glándula digestiva.



**Figuras III.18-20: Cortes histológicos de berberechos afectados por estadios larvarios de trematodos digeneos (II).** 18. Metacercarias, probablemente de *Meiogymnophallus minutus* vivas (punta de flecha) y muertas (asterisco) infectadas por un protozoo tipo microsporidio hiperparásito de berberecho y aisladas por proliferaciones del borde del manto del hospedador (flechas). Barra: 200  $\mu$ m. 19. Detalle a mayor aumento de las metacercarias de *M. minutus*. 20. Metacercaria enquistada en tejido muscular del pie de berberecho (punta de flecha). Obsérvese detalle de la corona de espinas cefálicas (flechas) propio del género *Himasthla* (Fam. Echinostomatidae). Barra figs. 19 y 20: 50  $\mu$ m.

En 16 bancos se localizaron copépodos no identificados en las branquias y cavidad paleal de los berberechos, con una prevalencia media del 8 %. El tejido branquial que rodeaba a los copépodos aparecía en algunos casos hipertrofiado y con una intensa reacción hemocitaria (Figura III.21). Copépodos de tipo *Mytilicola* se apreciaron también en el lumen intestinal de berberechos de 3 bancos con una prevalencia media del 4 % (Figura III.22). En algún caso, se observó una metaplasia consistente en el reemplazamiento de células cuboidales del epitelio intestinal por células columnares, causada por dicho copépodo intestinal. Los copépodos de la branquia fueron más prevalentes que los intestinales y se localizaron en más bancos. Sólo un berberecho estaba parasitado por los dos tipos de copépodos simultáneamente.



**Figuras III.21-22: Cortes histológicos de berberechos afectados por copépodos. 21.** Copépodo (punta de flecha) en branquia asociado con una reacción hemocitaria intensa. Barra: 100  $\mu\text{m}$ . **22.** Copépodo (punta de flecha) tipo *Mytilicola* en lumen intestinal. Barra: 200  $\mu\text{m}$ .



### **III.4.5. Reacciones hemocitarias**

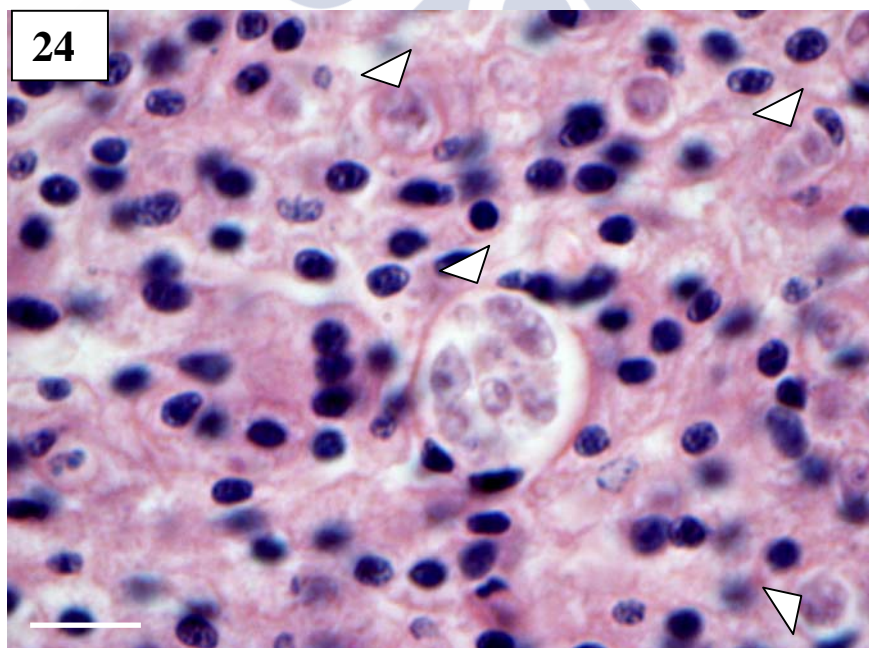
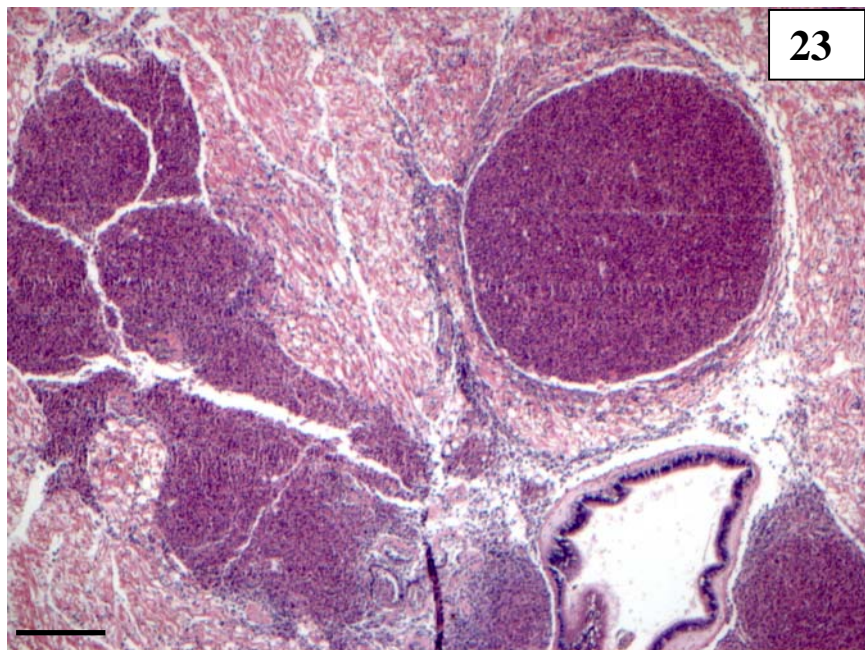
Frecuentemente se observaron reacciones hemocitarias de defensa en asociación con parásitos (por ejemplo, fases larvarias de trematodos digeneos y copépodos branquiales) y con alteraciones de naturaleza neoplásica. También se observaron infiltraciones hemocitarias relacionadas con reabsorción de tejido gonadal. Las infiltraciones hemocitarias se localizaban mayoritariamente en el tejido conjuntivo pero también en epitelio de los diferentes órganos. Reacciones hemocitarias locales fueron observadas en la mayoría de los órganos pero con mayor frecuencia en la glándula digestiva, branquias y pie. En ocasiones fue posible observar restos de parásitos en diferentes estados de degradación en el interior de granulocitomas. En algunos berberechos no se encontró asociación entre la aparición de reacciones inflamatorias y parásitos, neoplasia o reabsorción gonadal.

Se detectó una alteración patológica consistente en el desarrollo de grandes focos de hemocitos en diferentes órganos (branquias, glándula digestiva, riñón, corazón y pie), que se denominó como enfermedad de los focos grandes de infiltración hemocitaria intensa (Figura III.23). Se observaron además células no identificadas en el interior de los hemocitos que componen los focos (Figura III.24). Estas lesiones causaban la pérdida de la estructura normal de los tejidos y órganos del hospedador, siendo abundantes en algunos individuos. Esta alteración fue registrada en 8 bancos y con una prevalencia media del 14 %.

### **III.4.6. Comparaciones entre los diferentes bancos naturales**

Los resultados de este estudio mostraron que los berberechos de los bancos localizados en las rías más al norte tenían en general menores índices medios de parasitación que los de bancos de las rías más meridionales (Tabla III.1), lo que indica que en promedio poseían mayores prevalencias de las alteraciones y parásitos detectados.





**Figuras III.23-24: Cortes histológicos de berberechos afectados por focos grandes de infiltración hemocitaria intensa (FGIHI). 23.** FGIHI en tejido conjuntivo de gónada. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . **24.** Células no identificadas (puntas de flecha) en el interior de hemocitos que integran los FGIHI. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

### III.5. DISCUSIÓN

Los parásitos y alteraciones patológicas que se encontraron en berberechos de las rías gallegas se pueden clasificar en función de su patogenicidad. Basándose en registros de episodios de mortalidad y en las alteraciones morfológicas asociadas con los parásitos y patologías observadas, las enfermedades más graves son: neoplasia diseminada, infestación por trematodos digeneos, desarrollo de focos grandes de infiltración hemocitaria intensa e infección por haplosporidios. De entre éstas, la neoplasia diseminada y las infestaciones por trematodos son las de más trascendencia considerando que se detectaron en la mayoría de los bancos.

Los resultados indicaron que la neoplasia diseminada era una patología bastante generalizada en berberechos de la mayoría de los bancos gallegos. Dos preparaciones con cortes histológicos de berberechos gallegos afectados por neoplasia diseminada han sido incluidas en la colección del *Registry of Tumors in Lower Animals* de la Smithsonian Institution, Washington, DC, con los códigos RTLA 7232 y RTLA 7233. Aunque se ha detectado neoplasia en mejillones *Mytilus galloprovincialis* (Gutierrez & Sarasquete 1986; Villalba *et al.* 1997), almejas *Tapes decussatus* (Villalba *et al.* 1995) y ostras *Ostrea edulis* (Alderman *et al.* 1977) de Galicia, sólo en estas últimas la neoplasia ha alcanzado niveles epizoóticos y ha sido relacionada con episodios de mortalidad. Por el contrario, muy pocas almejas y mejillones se han visto afectados por esta enfermedad. La neoplasia diseminada también alcanzó niveles epizoóticos en poblaciones de berberecho de Irlanda, constatándose la transmisión entre berberechos por lo que se sugirió una etiología viral (Collins 1998; Collins & Mulcahy 2003).

En el presente estudio se distinguieron dos tipos diferentes de células neoplásicas que difieren en tamaño y forma del núcleo. Dos tipos diferentes de células neoplásicas han sido también descritas en otros bivalvos (Peters 1988; Moore *et al.* 1991; Elston *et al.* 1992). Éste y otros aspectos de esta patología se abordan más extensamente en los capítulos IV y V.

La otra alteración patológica de mayor importancia detectada en el presente estudio fue la parasitación por trematodos digeneos. Los berberechos que presentaron infestaciones intensas por esporoquistes tenían graves lesiones en sus tejidos que causaban castración gonadal y podían conducir a la muerte del hospedador. Estadios larvarios de trematodos digeneos pertenecientes a las familias Bucephalidae, Gymnophallidae, Echinostomatidae y Monorchidae han sido descritos en *C. edule*

(Lauckner 1983). El berberecho actúa tanto como hospedador primario como secundario en el ciclo de las especies de digeneos pertenecientes a estas familias citadas como parásitas de *C. edule*. En el caso del estudio actual, se detectaron afectando a los berberechos de las Rías gallegas esporoquistes y, en principio, dos tipos de metacercarias: metacercarias no enquistadas envueltas por proliferaciones epiteliales del borde del manto y metacercarias enquistadas en tejidos del berberecho. En el capítulo VI de esta memoria se profundiza en el estudio de los trematodos digeneos que afectan a los berberechos gallegos.

Han sido descritas varias especies de haplosporidios parásitos de bivalvos marinos. Entre éstas *Haplosporidium nelsoni* y *Haplosporidium costale* han causado pérdidas económicas muy importantes en la industria productora de ostra en Estados Unidos (Andrews 1984). En *Cerastoderma edule* han sido descritas esporas (10 x 7 µm) de *Haplosporidium ascidiarium* (Lauckner 1983). En el presente estudio fueron observados en tejido conjuntivo de *Cerastoderma edule* plasmodios, esporoblastos y esporas de un haplosporidio no identificado. Azevedo *et al.* (2003) describieron un haplosporidio encontrado infectando la glándula digestiva y tejidos circundantes del berberecho gallego como la especie nueva *Haplosporidium edule*. El haplosporidio detectado en el presente trabajo podría pertenecer a esta nueva especie, ya que el rango de tamaño de la espora y los tejidos en los que se detecta la infección son similares a los descritos por estos autores. El haplosporidio encontrado podría ser letal para los berberechos gallegos ya que, en infecciones intensas, el tejido conjuntivo fue destruido y ocupado por las esporas del parásito.

Hay otros parásitos que inducen daños ligeros o moderados a los berberechos en función de la intensidad de la infección. Este grupo está constituido por los quistes extracelulares que encierran organismos de tipo bacteriano, el coccidio *Pseudoklossia* sp., la gregarina *Nematopsis* sp. y los copépodos de la branquia. Los quistes branquiales extracelulares fueron observados en la mayor parte de los bancos naturales. El número de quistes observados en la mayoría de los berberechos fue bajo y sólo causaron lesiones locales. Sin embargo, cuando el número de quistes era alto producían alteraciones en la estructura branquial que podrían afectar a su normal funcionamiento. No fue determinada la posición taxonómica de las bacterias que aparecían en el interior de estos quistes. Podría tratarse de organismos de tipo rickettsiano, aunque parecían de mayor tamaño que los organismos observados en el interior de las colonias intracelulares más pequeñas detectadas también en branquia. Le Gall *et al.* (1988)

observaron en branquias de la vieira *Pecten maximus* la presencia de pequeñas colonias que contenían sólo unas pocas rickettsias y colonias mayores con tamaños semejantes a los de los quistes observados en los berberechos gallegos. Los coccidios del riñón fueron también muy prevalentes; con frecuencia las infecciones fueron ligeras e indujeron sólo lesiones pequeñas. Sin embargo, cuando la intensidad de las infecciones era elevada, éstas podrían llegar a originar disfunciones renales. Varias especies de *Pseudoklossia* han sido observadas en el riñón de bivalvos marinos (Lauckner 1983; Farley 1988; Bower & Figueras 1989; Bower *et al.* 1992; Robledo *et al.* 1994; Villalba *et al.* 1997; Dessler *et al.* 1998) pero hasta el momento ésta parece la primera cita de un coccidio renal que afecta a berberechos.

Gregarinas del género *Nematopsis* utilizan a los bivalvos como hospedadores intermediarios. Se han citado ovoquistes de *Nematopsis schneideri* y *N.portunidarum* en *C. edule* (Lauckner 1983). Una infección muy intensa de *Nematopsis* sp. fue asociada con mortalidad de berberechos portugueses (Azevedo & Cachola 1992). La ausencia de información referida a un ciclo vital completo, incluyendo al hospedador intermediario, impide la identificación de las especies de *Nematopsis* que parasitan a los berberechos de las costas de Galicia. La infección causada por *Nematopsis* sp. en berberechos y almejas normalmente está asociada a infiltraciones hemocitarias locales, pero sin efectos cuantificables sobre la salud del hospedador (Bower *et al.* 1994). Los berberechos gallegos con frecuencia tenían infecciones ligeras, que no causaron ningún daño apreciable. Sin embargo, unos cuantos individuos tenían numerosos ovoquistes que inducían reacciones hemocitarias locales intensas y pequeñas alteraciones en los filamentos branquiales.

El copépodo *Mytilicola intestinalis* ha sido observado en el intestino de un amplio rango de bivalvos, incluyendo *C. edule*. Aunque existe una gran controversia acerca de la gravedad de las lesiones inducidas por este copépodo en mejillón, no existe ningún informe acerca de su patogenicidad en berberechos (Bower *et al.* 1994). En el presente estudio, los copépodos observados en el intestino causaron poco daño, o por lo menos éste no era visible. Por el contrario, los copépodos de la branquia inducían frecuentemente lesiones locales, que podían alcanzar cierta patogenicidad en los berberechos parasitados por un número significativo de copépodos. El copépodo *Lichomolgus leptodermatus* causó lesiones branquiales similares en el berberecho *Laevicardium crassum*. Otros copépodos pertenecientes al género *Myicola* también



causaron daños en branquia de ostras, *Crassostrea gigas* y *C. angulata*, y en almejas, *Mya arenaria* (Lauckner 1983).

Hubo otros organismos que no causaron daño significativo a los berberechos, como las gregarinas no identificadas y un microsporidio tipo *Stenhausia* que inducían respuestas hemocitarias muy ligeras y localizadas. La prevalencia e intensidad de estos protistas fue baja. Colonias intracelulares de organismos de tipo rickettsiano, *Paravortex cardii*, *Trichodina* sp., y ciliados tipo *Rhynchodida* tampoco causaron respuestas inflamatorias.

La posición taxonómica de los organismos de tipo rickettsiano que se observan en células de los túbulos digestivos y branquia no pudo ser determinada. No se detectó correlación entre la presencia de rickettsias en digestivo y en branquia, por lo que se infiere que se trata probablemente de especies diferentes. Las colonias intracelulares de organismos de tipo rickettsiano no causaron ningún daño apreciable en el hospedador. Sin embargo infecciones intensas de estos parásitos podrían resultar muy patogénicas ya que en algunos bivalvos como vieiras, almejas y oreja de mar se han relacionado estas infecciones rickettsiales con mortalidades (Gulka & Chang 1984; Elston 1986; Le Gall *et al.* 1988; Norton *et al.* 1993; Renault & Cochenec 1994; Villalba *et al.* 1999; Friedman *et al.* 2000; Moore *et al.* 2000).

La gregarina no identificada y el microsporidio tipo *Stenhausia* no habían sido citados con anterioridad en berberecho. Gregarinas no identificadas similares a las observadas en berberecho fueron encontradas en el intestino y tejido conjuntivo circundante de la almeja *Tapes philippinarum* (Bower *et al.* 1992), *Tapes decussatus* de Galicia (López 1995), y ostras *Crassostrea gigas* (Elston *et al.* 1998). *Stenhausia mytilovum* and *S. ovicola* han sido descritas parasitando los ovocitos de mejillones y ostras (Lauckner 1983; Bower *et al.* 1994; Robledo *et al.* 1994; Villalba *et al.* 1997).

Existe cierta controversia acerca del papel patológico de los ciliados de tipo *Trichodina*. Se le han atribuido mortalidades de *C. edule* y ostras *Crassostrea angulata* (Lauckner 1983). Ostras, *C. gigas*, con una alta tasa de infección por *Trichodina* sp., exhibieron una respuesta inflamatoria y alteraciones del epitelio branquial (Boussaid *et al.* 1999). Sin embargo, se observaron individuos de este ciliado en la cavidad paleal de berberechos durante el presente estudio sin ningún tipo de daño aparente. Tampoco se detectaron daños en *Tapes philippinarum* de Canadá (Bower *et al.* 1992).

Los parásitos más prevalentes que se observaron en berberechos de la mayoría de los bancos estudiados pueden considerarse como las especies componentes de los

organismos simbioses asociados a los berberechos de la costa de Galicia. Éstos incluirían la gregarina *Nematopsis* sp., estados larvarios de diferentes especies de trematodos, *Paravortex cardii*, quistes branquiales que contienen organismos de tipo bacteriano, *Trichodina* sp. y otros ciliados branquiales, y, un coccidio, *Pseudoklossia* sp. Los organismos intracelulares de tipo rickettsiano en células de branquia y digestivo, aunque menos prevalentes se detectaron en la mayoría de los bancos. Los copépodos observados en branquia e intestino, las gregarinas no identificadas, y la enfermedad de los focos grandes de infiltración hemocitaria intensa sólo fueron observados en algunos bancos. El resto de organismos simbioses descritos pueden considerarse como raros.

Como tendencia general, las poblaciones de berberecho situadas en las rías más al norte (*Rías Altas*) sufrían una mayor prevalencia en la mayoría de las alteraciones encontradas en relación a las Rías de más al sur (*Rías Baixas*). Las *Rías Altas* tienen una superficie mucho más reducida que las *Rías Baixas*, asimismo su configuración geográfica corresponde a estuarios cerrados de menor amplitud con menores tasas de renovación de agua. Una configuración de costa cerrada, en contraste con una costa de mar abierto o bahía amplia, facilita la concentración de los estados infectivos de los parásitos y por ello se incrementa enormemente la probabilidad de contacto entre dichas fases y el molusco hospedador. Es interesante reseñar también que las Rías del Norte tienen producciones más bajas que las del sur (informes internos de la Xunta de Galicia), si bien la superficie productiva es menor. Son necesarios estudios adicionales para explicar las causas de estas tendencias y la posible influencia de las condiciones ambientales. No se encontraron, sin embargo, tendencias espaciales claras en la distribución de las alteraciones.

**IV. ESTUDIO DE UNA NEOPLASIA DISEMINADA  
EN EL BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE  
LA COSTA DE GALICIA (I)**

**CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA Y  
COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE  
DIAGNÓSTICO MEDIANTE MICROSCOPIA  
ÓPTICA**

---





#### **IV. ESTUDIO DE UNA NEOPLASIA DISEMINADA EN EL BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA (I). CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA Y COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA**

##### **IV. 1. RESUMEN**

Se llevó a cabo un estudio de caracterización histopatológica y morfológica de la neoplasia diseminada que afecta a berberechos *Cerastoderma edule* de las Rías gallegas. Se distinguieron dos tipos de células neoplásicas. Un primer tipo (tipo A) que se caracterizó por la proliferación de células anormales en los senos y espacios vasculares del sistema circulatorio y en tejido conjuntivo de gónada, glándula digestiva y manto; extendiéndose hacia el resto de tejidos conforme se incrementaba la intensidad de la neoplasia diseminada. Estas células tipo A eran redondeadas, de gran tamaño, poseían un núcleo pleomórfico muy grande y una relación núcleo/citoplasma muy elevada. Se observaron con frecuencia figuras mitóticas. En algunos casos minoritarios se observó cierta capacidad defensiva por parte de los hemocitos contra estas células neoplásicas. El segundo tipo de células neoplásicas (tipo B) apareció con prevalencias muy bajas y se caracterizó por presentar un tamaño inferior y forma redondeada. El citoplasma era escaso y aparecía como un anillo que rodeaba a un núcleo perfectamente centrado y que siempre poseía un único nucleolo. Estas células presentaron un mayor grado de agrupación celular, y se encontraron formando masas condensadas de apariencia tumoral que invadían en primer término el tejido conjuntivo de branquia, posteriormente tejido conjuntivo de la gónada y, en casos de alta intensidad, resto de órganos del berberecho. Los dos tipos de células neoplásicas observadas presentaron características ultraestructurales similares, con núcleos de gran tamaño, nucleolos muy patentes y una variedad muy pobre de orgánulos celulares en el citoplasma, entre los que destacaron abundantes vesículas, vainas de mielina y mitocondrias que parecían hinchadas. No se pudo concluir si ambos tipos de células neoplásicas correspondían a dos líneas celulares diferentes, o si se trataba de dos tipos morfológicos diferentes correspondientes a una única línea celular.

Se realizó la comparación de tres técnicas de diagnóstico de neoplasia diseminada mediante microscopía óptica: dos técnicas hemocitológicas (FP: frotis poli-L-lisina y FC: frotis citospin) y una técnica histológica (TH) clásica. Se pretendía

determinar cuál era la técnica más adecuada para la detección y la determinación de la intensidad de dicha enfermedad en el berberecho *Cerastoderma edule*. Aunque cada una de las técnicas ensayadas dio algún falso negativo, los resultados globales parecen indicar que la FP es más sensible que la FC y que la TH. De manera general para todas las técnicas, aquellos casos de neoplasia que fueron detectados por alguno de los procedimientos pero no por los otros, fueron neoplasias de baja intensidad. La elección de la técnica más adecuada dependerá de los objetivos del diagnóstico. En el caso del desarrollo de estudios epizootiológicos dirigidos a la gestión de poblaciones naturales se recomienda el empleo combinado de las técnicas TH y FP, ya que la riqueza de la información obtenida es mucho mayor.

## SUMMARY

A study of characterization of disseminated neoplasia affecting Galician cockles was performed. Two types of neoplastic cells were detected. First type (type A) was characterized by the proliferation of abnormal cells in the hemolymph vessels and connective tissue surrounding gonad, digestive gland and mantle. These cells invaded another tissues with the increase of the disease severity. These abnormal cells were round, large and presented a large pleomorphic nuclei with a high nucleus-to-cytoplasm ratio. Mitotic figures were frequently observed. Hemocytes of some few cockles presented defence reaction against these neoplastic cells. Second neoplastic cell type (type B) was less prevalent and were round and smaller than the first type. Their cytoplasm was scarce and had a nucleus with only a single nucleolus. These cells were tightly packed, had a tumour appearance and first colonized the connective tissue of the gills and then invaded the gonad and other tissues of the host. Ultrastructure features of both neoplastic cells were similar, with large nuclei, prominent nucleoli and very few cytoplasm organelle: abundant vesicles, myelinoid figures and swollen mitochondria. It could not be concluded if both neoplastic cells types were two truly separate neoplastic types or if they reflect several aspects of the dynamics of neoplastic cell proliferation.

Three optical microscopic diagnostic methods were compared to determine what it is more sensible and reliable to diagnose disseminated neoplasia in Galician cockles: two hemocytological techniques (PS: poly-L-lisine smear; and CS: citospin smear) and one histological technique (HT). All the techniques presented some false negative diagnose, but global results indicated that PS was the technique most sensible.

Neoplastic cases detected by one technique but not for another were, in general, low-level intensity neoplasias. The choice of the most suitable technique depends of the objectives searched by the study. For epizootiological studies of natural populations HT and PS techniques are recommended, because the information achieved is more reliable and complete.

## IV.2. INTRODUCCIÓN

A mediados de los años 80 se detectó neoplasia diseminada en poblaciones de berberecho de Irlanda (Twomey & Mulcahy 1984) y de la Bretaña francesa (Poder & Auffret 1986), patología que causa mortalidad en esta especie (Twomey & Mulcahy 1988b). Carballal *et al.* (2001) encontraron niveles epizootiológicos de neoplasia diseminada en numerosas poblaciones de berberecho de las Rías gallegas con características histopatológicas que coinciden con las de las neoplasias de berberecho previamente descritas (capítulo III). En el presente capítulo se aborda la caracterización celular y tisular de la neoplasia que afecta a los berberechos gallegos.

La neoplasia diseminada generalmente no es reconocible mediante un examen externo de los especímenes (Farley 1969a, Brown *et al.* 1977). Las primeras citas sobre moluscos bivalvos afectados por neoplasia se efectuaron en base al análisis de cortes histológicos realizados a partir de tejidos fijados del organismo (Farley 1969a, b; Yevich & Barszcz 1976). Este método es todavía el principal método de diagnosis, aunque se han desarrollado técnicas clínicas no letales que permiten un seguimiento de la evolución temporal de la enfermedad (Peters 1988). Entre estas técnicas destacan las basadas en el examen directo de la hemolinfa y sus componentes celulares, denominadas inicialmente “histocitológicas” por Farley *et al.* (1986), y “hemocitológicas” en revisiones posteriores (Peters 1988; Elston *et al.* 1992). Normalmente cuando la neoplasia diseminada es muy intensa la diagnosis mediante métodos basados en la morfología celular resulta sencilla, siendo mucho más compleja en estadios iniciales de desarrollo de la enfermedad, ya que implica la identificación de células raras distribuidas focalmente que aún no presentan las características típicas de anaplasia celular propias de las células neoplásicas (Smolowitz *et al.* 1989). Para solucionar estos casos de diagnosis compleja se implementó el desarrollo de anticuerpos específicos para células neoplásicas, normalmente unidos a técnicas de

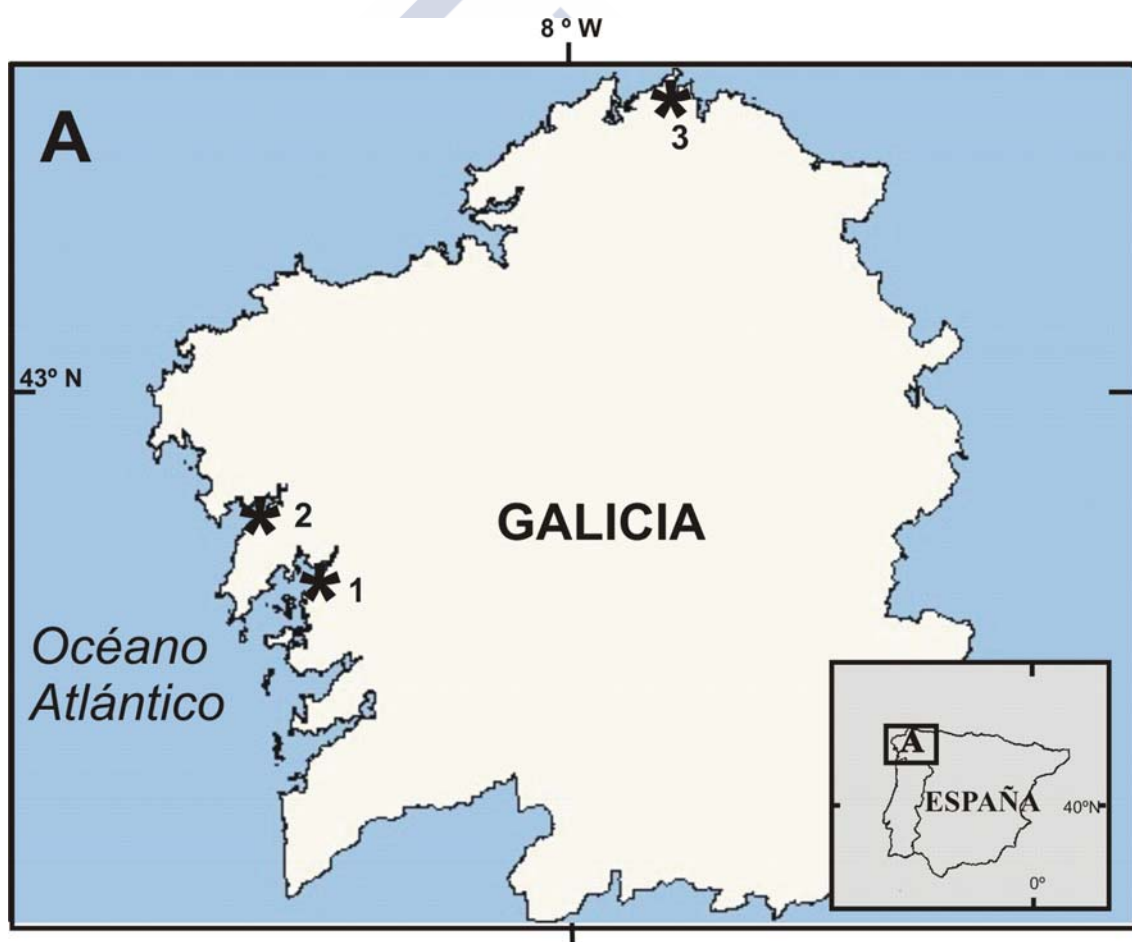
inmunohistoquímica que permiten criterios de diagnóstico colorimétricos (Smolowitz & Reinisch 1986; Leavitt *et al.* 1990). Otra aproximación muy objetiva se basa en la medida del contenido de ADN en muestras de hemolinfa mediante citometría de flujo. La citometría de flujo es capaz de medir miles de células por minuto y proporcionar histogramas de contenido de ADN. Puesto que la dotación de ADN en las células neoplásicas es claramente superior a la de los hemocitos normales (Lowe & Moore 1978), la citometría de flujo proporciona estimas cuantitativas muy precisas de la proporción de células normales y neoplásicas (Elston *et al.* 1990; Elston *et al.* 1992; Smolarz *et al.* 2005; Díaz *et al.* 2005; da Silva *et al.* 2005b). La sensibilidad del método es, sin embargo, menor que las técnicas histológicas y hemocitológicas en casos de bajos niveles de intensidad de neoplasia (Moore *et al.* 1991). Esto unido a lo costoso que resulta esta técnica reduce su utilización a programas de investigación concretos más que para estudios de seguimiento de poblaciones naturales.

Puesto que era la primera vez que se emprendía el estudio de la neoplasia diseminada en berberechos de Galicia, se consideró fundamental el desarrollo y puesta a punto de técnicas de diagnóstico adecuadas para abordar diferentes aspectos de la misma en estudios ulteriores. En este capítulo se exponen los resultados del desarrollo de dichas técnicas, así como de la comparación de su sensibilidad y capacidad de estimación de la intensidad de la enfermedad.

### IV.3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### IV.3.1. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD

Con el fin de caracterizar las células neoplásicas, detectadas en tejidos de berberecho en el trabajo de cartografiado de las principales patologías que afectan a *Cerastoderma edule* de Galicia (capítulo III), se tomaron muestras de berberechos en dos bancos que presentaban una prevalencia elevada de esta patología. Los bancos elegidos fueron *Misela* (Cofradía de Noia) y *Villabril* (Cofradía de O Vicedo) (Figura IV.1). Las muestras se procesaron mediante técnicas clásicas de histología y mediante microscopía electrónica de transmisión.



**Figura IV.1:** Poblaciones naturales de berberecho muestreadas para el estudio de diferentes aspectos de la neoplasia diseminada. 1. *Lombos do Ulla* (Cofradía de Carril); 2. *Misela* (C. de Noia); 3. *Villabril* (C. de O Vicedo).

#### **IV.3.1.1. Análisis de cortes histológicos**

Los berberechos recolectados en los bancos anteriormente mencionados se transportaron en condiciones de refrigeración al laboratorio y se mantuvieron en tanques con agua de mar filtrada en circuito cerrado durante una noche, con el fin de permitir la eliminación de arena y otras partículas sólidas existentes en el aparato digestivo. A continuación se procedió según el protocolo de procesamiento histológico descrito en el apartado III.3 de esta memoria, con la salvedad de que se extrajeron adicionalmente pequeñas piezas (1-2 mm de grosor) de tejido que fueron fijadas en solución de Carson [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 23,8 g; Na OH: 4,21 g; agua destilada: 900 ml; formaldehído al 40 %: 100 ml (Pearse 1980)]. Esta solución mantiene los tejidos en un estado de conservación adecuado para su posterior procesamiento y estudio mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión, durante el tiempo necesario para que la diagnosis histológica previa de los individuos tenga lugar. La observación de las preparaciones histológicas se realizó mediante microscopía óptica.

#### **IV.3.1.2. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)**

El estudio de células neoplásicas mediante MET se realizó tanto con muestras de tejidos blandos como de hemolinfa de berberechos afectados por la enfermedad. Los tejidos blandos de berberechos diagnosticados mediante histología como afectados por neoplasia en un grado de intensidad medio y elevado, se extrajeron de la solución fijadora de Carson y se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en tampón PIPES (Sigma) 0,1 M (pH 7,2) durante 2 horas a 4 °C. A continuación se lavaron en tampón PIPES y fueron postfijados mediante tetróxido de osmio al 1 % en PIPES durante 2 horas a 4 °C. Tras un proceso de deshidratación en una serie de alcoholes de graduación creciente (50° - 100°), fueron incluidos en resina de epon. Finalmente se realizaron cortes ultrafinos de los bloques resultantes, que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 operando a 80 kV.

Para el estudio de células neoplásicas en hemolinfa mediante MET, previamente se extrajo hemolinfa del músculo aductor posterior de los berberechos, tal y como se indica en el apartado IV.3.2.2, y se procedió según la técnica de adhesión de hemocitos mediante citocentrifugación que se describe en la sección IV.3.2.4, con el fin de seleccionar berberechos con una intensidad elevada de neoplasia diseminada. De cada



uno de los berberechos seleccionados se extrajo hemolinfa (según relación volumétrica 1:1) en solución fijadora (glutaraldehído al 5 % en tampón PIPES 0,1 M, pH 7,2), y se agrupó la hemolinfa de 5 berberechos. La fijación tuvo lugar durante 1 hora a 4 °C. A continuación se eliminó el fijador mediante centrifugación (750 g, 10 minutos), las células se lavaron en tampón PIPES y se postfijaron en tetróxido de osmio tamponado al 1 % durante 1 hora a 4 °C. Tras un lavado, el sedimento celular se incluyó en 1,5 % de agar a 40 °C. Después de centrifugar (1700 g, 5 minutos), el agar se solidificó formando una masa que se cortó en pequeñas piezas que se deshidrataron en una serie creciente de etanol, se transfirieron a óxido de propileno y se incluyeron en epon. Tras este proceso se procedió a la realización de cortes ultrafinos y a su contraste y observación en las mismas condiciones que las previamente descritas para el caso de tejidos blandos.

#### **IV.3.2. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA**

La comparación entre técnicas de diagnóstico de neoplasia diseminada se abordó en dos etapas. Una primera en la que se ensayaron tres técnicas de diagnosis: dos hemocitológicas [frotis de hemolinfa mediante citocentrifugación (FC), y frotis por adhesión espontánea de hemocitos a portaobjetos tratados con poli-L-lisina (FP)] y una técnica histológica (TH) clásica; y en la que se evaluó la sensibilidad de diagnóstico de las mismas y su capacidad para estimar la intensidad de la neoplasia mediante el empleo de escalas basadas en la diferenciación de estados discretos de desarrollo de la enfermedad. En estos primeros ensayos se determinaron como más sensibles la TH y FP (apartado IV.4.2.1), por lo que en la segunda etapa se profundizó en la comparación de ambas técnicas mediante su aplicación en el desarrollo de un estudio de evolución de la prevalencia de la neoplasia en un banco natural (*Misela*), empleando además una escala continua de intensidad de neoplasia diseminada en la técnica FP.

##### **IV.3.2.1. Recolección de las muestras**

En la primera etapa se recogieron un total de 116 berberechos (*Cerastoderma edule*) de talla comercial ( $L > 28$  mm) en el banco natural de *Misela* (Ría de Noia) a lo largo de tres muestreos que tuvieron lugar en junio ( $n = 46$ ), julio ( $n = 46$ ) y noviembre ( $n = 24$ ) de 1999. En la segunda, se analizó la evolución de la prevalencia e intensidad

de la neoplasia en *Misela* a lo largo de 1 año completo mediante FP y TH, para lo cual se tomaron muestras de 25 individuos adultos de talla comercial con periodicidad mensual entre los meses de noviembre de 1999 y noviembre de 2000.

#### **IV.3.2.2. Extracción de hemolinfa**

Se practicó una muesca a los berberechos con ayuda de una lima en la unión de las valvas a la altura del músculo aductor posterior (Figura IV.2), y se extrajo hemolinfa del seno existente en dicho músculo, empleando aguja y jeringuilla estériles (Figura IV.3). Esta hemolinfa fue utilizada para la realización de frotis mediante las dos técnicas que se describen en los apartados IV.3.2.4 y IV.3.2.5.



**Figura IV.2:** Muesca practicada en el borde posterior del berberecho con el fin de extraer la hemolinfa.



**Figura IV.3:** Extracción de hemolinfa con aguja y jeringuilla estériles.



#### **IV.3.2.3. Diagnóstico histológico**

Una vez extraída la hemolinfa, los berberechos fueron liberados de su concha y se procedió a su procesamiento histológico según la técnica ya descrita en el apartado III.3. El análisis de los cortes histológicos correspondientes se realizó mediante microscopía óptica.

#### **IV.3.2.4. Técnica de adhesión de hemocitos a portaobjetos mediante citocentrifugación**

De cada individuo se extrajeron 0,1 mL de hemolinfa mediante aguja y jeringuilla en solución antiagregante de Alsever (Bachère *et al.* 1988) según relación volumétrica hemolinfa:Alsever (1:3). Cada muestra se depositó en un vial y se mantuvo refrigerada. A continuación 150 µL de la misma se sometieron a citocentrifugación durante 5 minutos, a 92 g y 4 °C empleando una centrífuga *Megafuge 1.0 R* (Heraeus). Se consiguen así monocapas de hemocitos depositadas sobre portaobjetos, que se fijan y tiñen empleando el kit comercial Hemacolor (Merk). Las preparaciones se montaron a continuación y se estudiaron al microscopio óptico.

#### **IV.3.2.5. Técnica de adhesión de hemocitos a portaobjetos tratados con poli-L-lisina**

Se extrajeron en este caso entre 0,1 y 0,5 mL de hemolinfa del seno existente en el músculo aductor posterior con aguja y jeringuilla estériles, manteniéndose en refrigeración hasta el momento de la adhesión con el fin de evitar la agregación hemocitaria. Se dispusieron 50 µL de hemolinfa en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y se permitió que tuviese lugar la adhesión de los hemocitos durante 30 minutos en cámara húmeda. El recubrimiento del portaobjetos con poli-L-lisina mejora la adhesividad de las células neoplásicas debido a fuerzas de atracción electrostática entre la membrana celular y la poli-L-lisina (Appeldoorn *et al.* 1984); su utilización es necesaria ya que éstas no producen pseudópodos y normalmente no se fijan al vidrio (Cooper *et al.* 1982a). Pasado este tiempo se fijaron durante 5 minutos en glutaraldehído al 1,25% en tampón fosfato 0,01M (pH 7,4) (Auffret 1989); tiñéndose a continuación con reactivo de Schiff (Collins 1998). Las preparaciones se montaron y se examinaron al microscopio óptico.

#### **IV.3.2.6. Sensibilidad de diagnóstico**

La sensibilidad de diagnóstico de cada técnica se calculó como el porcentaje de berberechos diagnosticados como neoplásicos por cada una de las técnicas con respecto al total de berberechos con neoplasia detectados por alguna de las tres técnicas comparadas. Las comparaciones del porcentaje de berberechos neoplásicos detectado por cada técnica se realizó mediante tests no paramétricos de Friedman, en el que los tratamientos fueron las técnicas y los bloques fueron las muestras.

En el caso del análisis de la evolución temporal de la prevalencia de la neoplasia mediante la TH y la FP, se calcularon índices de correlación por rangos de Spearman entre los valores determinados por ambas técnicas.

#### **IV.3.2.7. Estimación de la intensidad**

En el caso de la comparación de las tres técnicas realizada en un primer ensayo, la intensidad de la neoplasia diseminada detectada por cada técnica se estableció aplicando los siguientes criterios:

##### *Técnica histológica*

La intensidad de la neoplasia se clasificó en función de una escala arbitraria que contempla cinco categorías de intensidad y que es modificación de la de Mix (1983):

**Estado 0:** Ausencia de células neoplásicas en los tejidos.

**Estado 1:** Células neoplásicas aparecen en tejido conjuntivo del manto y de la zona circundante de la glándula digestiva y gónada.

**Estado 2:** Pequeños focos de células neoplásicas en los mismos tejidos que en el estado 1 y migración de células neoplásicas hacia otros tejidos.

**Estado 3:** Presencia de focos de células neoplásicas en todos los tejidos.

**Estado 4:** Grandes focos de células neoplásicas en todos los tejidos del organismo con destrucción de los mismos.

### *Técnicas hemocitológicas*

Se observaron 10 campos al azar con el objetivo de 20x anotando si aparecían o no células neoplásicas en cada uno de los campos. De no detectarse ninguna en estos 10 campos, se hacía un barrido de la preparación para asegurarse de que la muestra estaba libre de la enfermedad. De aparecer células neoplásicas en todos los campos 20x se procedía a examinar otros 10 campos al azar con el objetivo de 40x. En base a esto se estableció la siguiente escala, que distingue cuatro niveles de intensidad (0: *ausencia de neoplasia*; 1: *neoplasia ligera*; 2: *moderada*; e 3: *intensa*):

- ***Ausencia de neoplasia:*** No se detecta ninguna célula neoplásica.
- ***Neoplasia ligera:*** No todos los campos observados a 20x presentaban células neoplásicas. Si no se localizaba ninguna célula neoplásica en ninguno de los 10 campos examinados pero sí en el recorrido total de la preparación se consideraba que la neoplasia era inicial.
- ***Neoplasia moderada:*** Todos los campos 20x presentan células neoplásicas.
- ***Neoplasia intensa:*** Existen células neoplásicas en los 10 campos al azar estudiados a 40x.

En el caso de la comparación entre la TH y la FP realizada en la segunda etapa, se empleó para la TH la escala de Mix modificada (1983) previamente definida y, en el caso de la FP, una escala cuantitativa continua basada en examinar un total de 100 células por cada preparación hemocitológica, determinando el porcentaje de células neoplásicas presente. Aquellos frotis que resultaron negativos en la evaluación de 100 células fueron totalmente inspeccionados a continuación para determinar si la neoplasia estaba presente en una proporción menor del 1% (asignándole en este caso un valor arbitrario de 0,1 %) o si el individuo estaba libre de la enfermedad (0%).

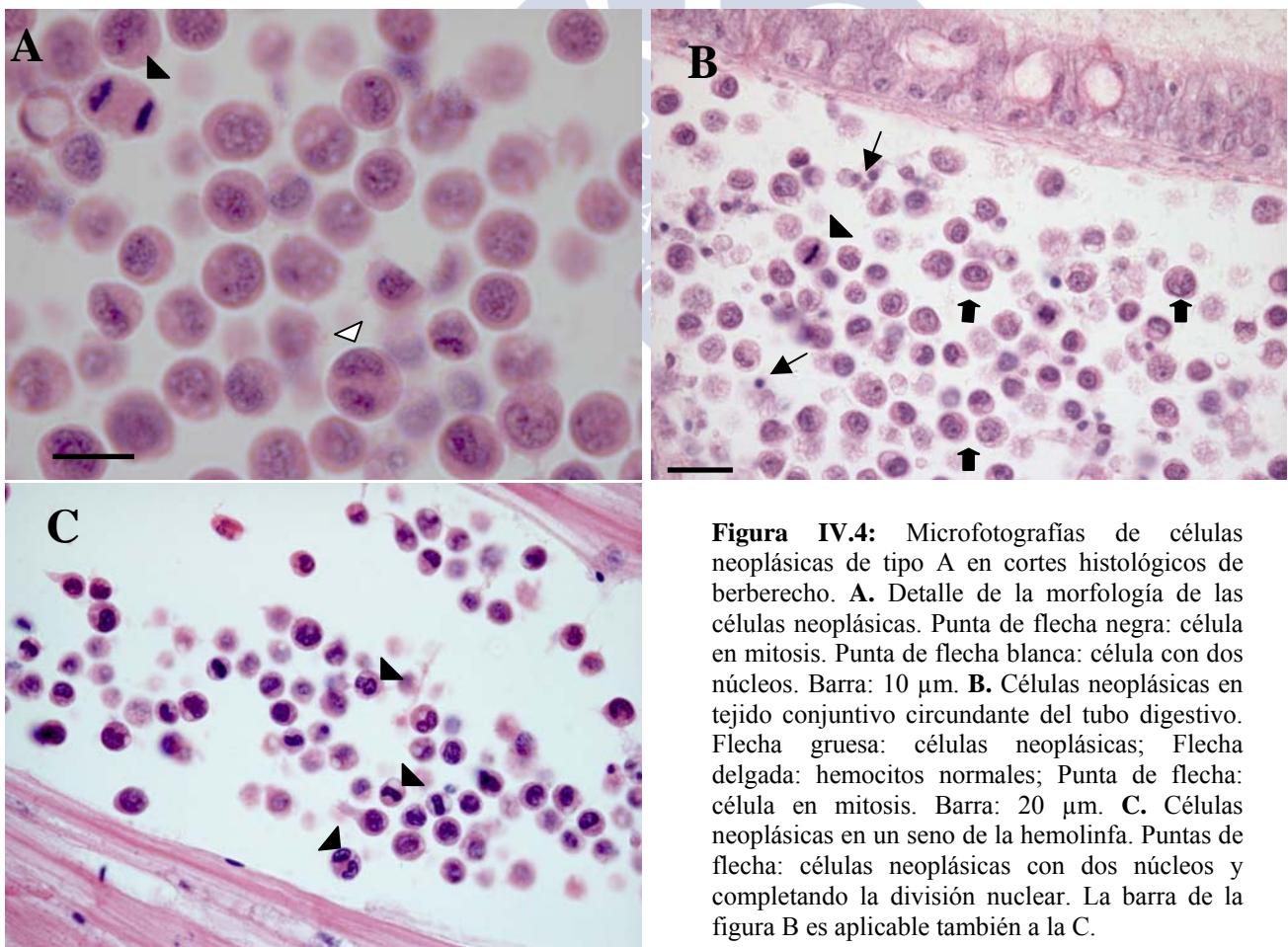
Para comparar la correspondencia entre la intensidad de neoplasia determinada por las distintas técnicas se calcularon índices de correlación por rangos de Spearman.

## IV.4. RESULTADOS

### IV.4.1. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD

#### IV.4.1.1. Análisis de cortes histológicos

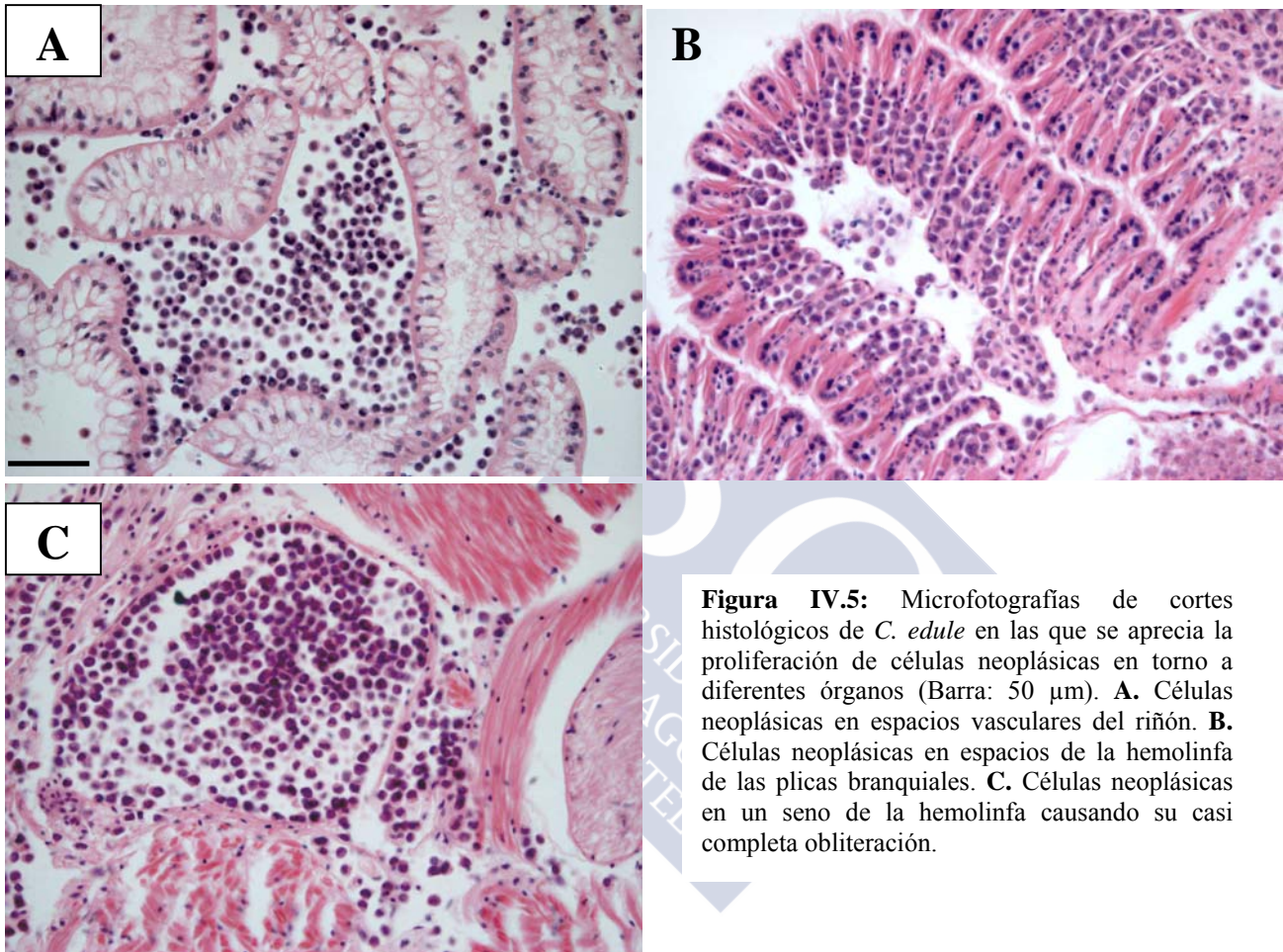
El análisis de las preparaciones histológicas reveló la proliferación de células anormales en los senos y espacios vasculares del sistema circulatorio y en el tejido conjuntivo de la gónada, glándula digestiva y manto. Estas células anormales eran redondeadas u ovaladas, presentaban un gran tamaño ( $8,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  de diámetro; media  $\pm$  EE,  $n=25$ ) y poseían un núcleo pleomórfico de tamaño elevado ( $5,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) con uno o varios nucleolos muy patentes. El citoplasma resultaba escaso en comparación con el tamaño del núcleo, y así estas células presentaban una relación núcleo/citoplasma muy elevada. En casos con una alta intensidad de afectación por células neoplásicas éstas presentaban abundantes figuras mitóticas y en algunos casos dos o más núcleos (Figura IV.4).



**Figura IV.4:** Microfotografías de células neoplásicas de tipo A en cortes histológicos de berberecho. **A.** Detalle de la morfología de las células neoplásicas. Punta de flecha negra: célula en mitosis. Punta de flecha blanca: célula con dos núcleos. Barra:  $10 \mu\text{m}$ . **B.** Células neoplásicas en tejido conjuntivo circundante del tubo digestivo. Flecha gruesa: células neoplásicas; Flecha delgada: hemocitos normales; Punta de flecha: célula en mitosis. Barra:  $20 \mu\text{m}$ . **C.** Células neoplásicas en un seno de la hemolinfa. Puntas de flecha: células neoplásicas con dos núcleos y completando la división nuclear. La barra de la figura B es aplicable también a la C.

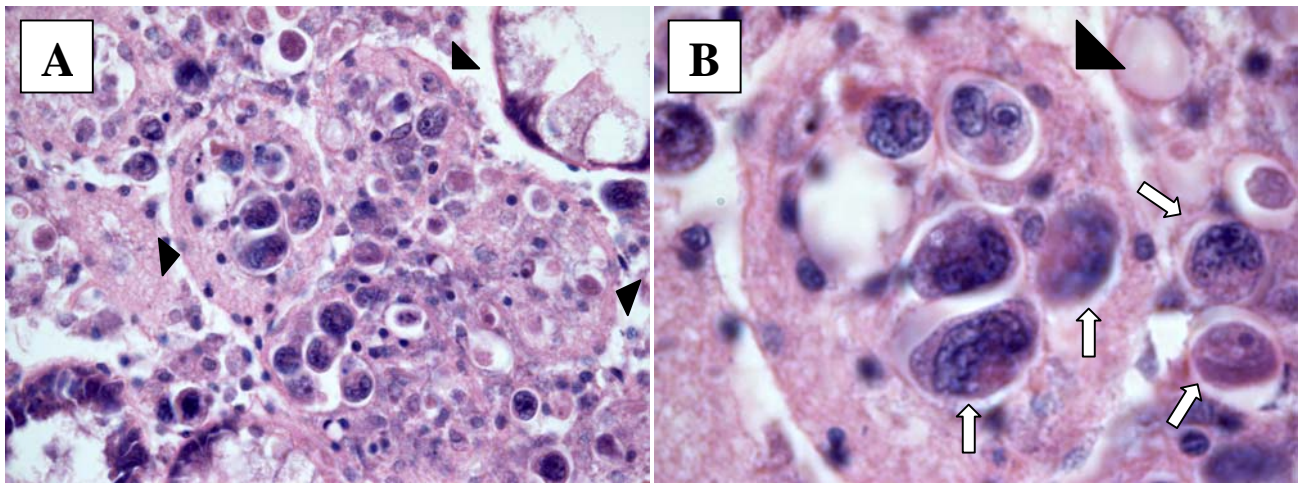


Se observó una proliferación progresiva de las células neoplásicas hacia otros órganos como riñón y branquia, conforme aumentaba la intensidad de la enfermedad, de forma que progresivamente ocupaban todo el espacio de los senos de la hemolinfa, originando la obliteración de los mismos y en asociación con la desaparición de los tejidos normales y necrosis en casos avanzados (Figura IV.5).



**Figura IV.5:** Microfotografías de cortes histológicos de *C. edule* en las que se aprecia la proliferación de células neoplásicas en torno a diferentes órganos (Barra: 50  $\mu$ m). **A.** Células neoplásicas en espacios vasculares del riñón. **B.** Células neoplásicas en espacios de la hemolinfa de las plicas branquiales. **C.** Células neoplásicas en un seno de la hemolinfa causando su casi completa obliteración.

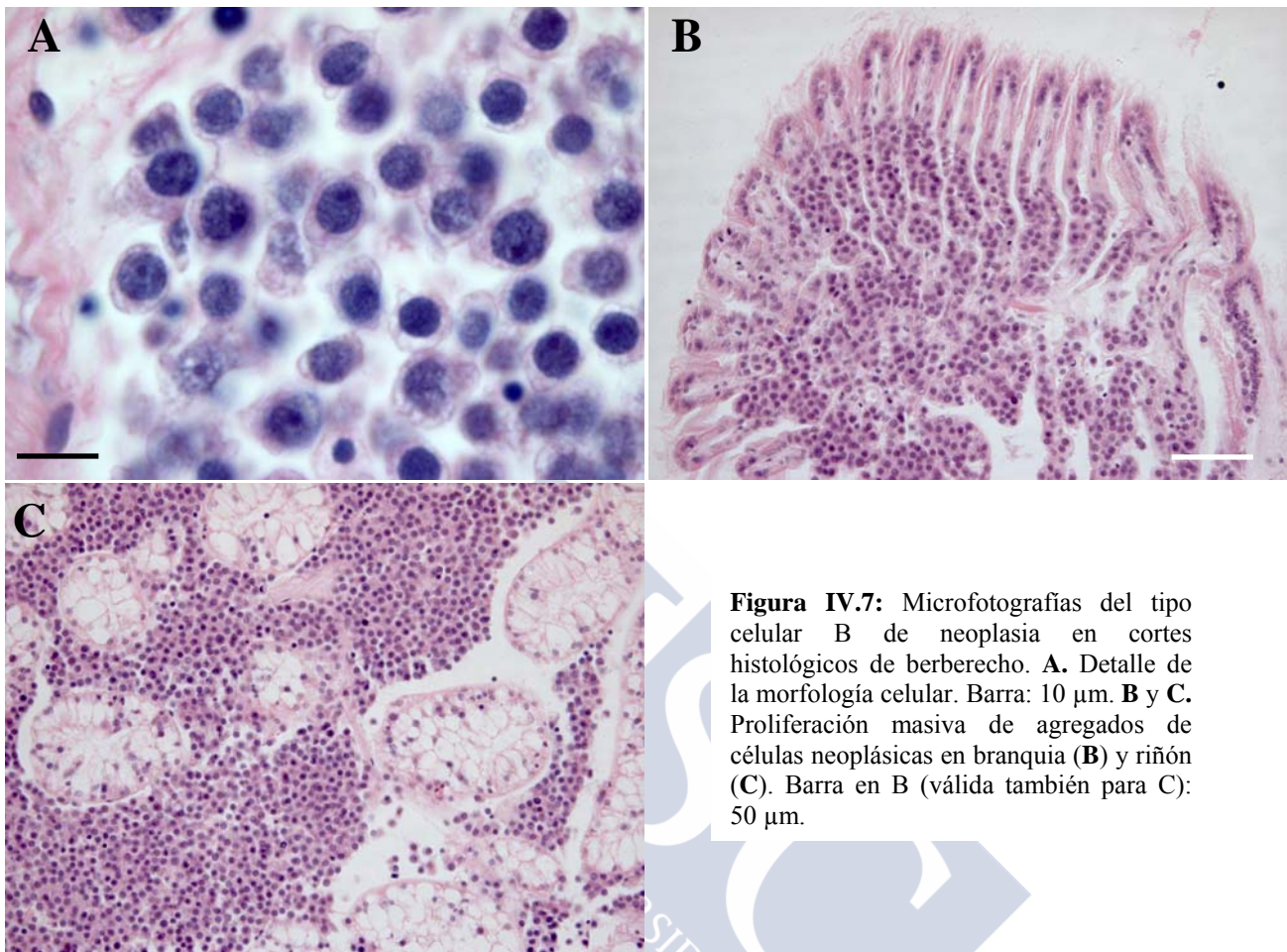
En algunos casos aislados se detectó cierta capacidad de defensa por parte del hospedador contra la proliferación de células neoplásicas. Dicha acción defensiva se basó en el desarrollo de reacción hemocitaria, consistente en granulocitomas y en la producción de un material fibroso que incluía y aislaba las células neoplásicas (Figura IV.6).



**Figura IV.6:** Cortes histológicos de *C. edule* en los que se observa reacción hemocitaria defensiva contra células de neoplasia diseminada. **A.** Granulocitomas (puntas de flecha) que incluyen y aíslan células neoplásicas en el seno del tejido conjuntivo circundante a los divertículos digestivos. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . **B.** Detalle de uno de estos granulocitomas (punta de flecha) con células neoplásicas incluidas en su interior (flechas blancas). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

En algunos berberechos se distinguió un segundo tipo de células neoplásicas de tamaño inferior ( $7,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) al que se denominó B para distinguirlo del más frecuente descrito previamente que se denominó tipo A. Estas células neoplásicas de tipo B presentaban forma redondeada y un citoplasma reducido a un escaso anillo que rodeaba al núcleo central de  $4,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$  de diámetro. El núcleo tenía una alta afinidad por la hematoxilina, un patrón de cromatina reticulado y un único nucleolo (Figura IV.7A). Se distinguieron figuras mitóticas pero en mucha menor proporción que en el tipo celular de neoplasia A. Las células neoplásicas de tipo B presentaron un mayor grado de agrupación, de forma que se encontraban formando masas condensadas que aparecían en primer término en el tejido conjuntivo de branquia (formando masas tumorales), posteriormente invadían el tejido conjuntivo de la gónada y, en casos de alta intensidad, el resto de órganos del berberecho (Figura IV.7B y C).



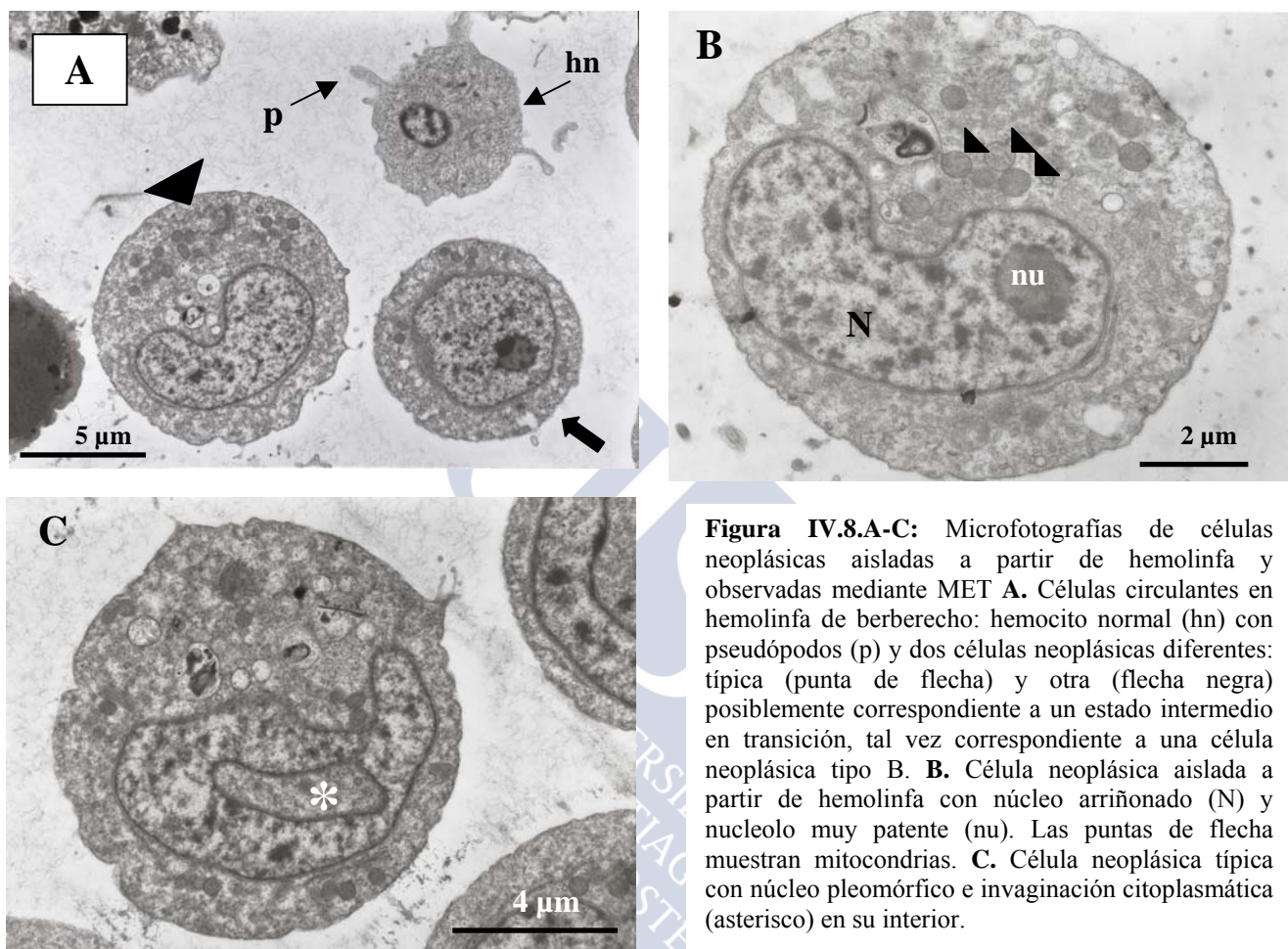


**Figura IV.7:** Microfotografías del tipo celular B de neoplasia en cortes histológicos de berberecho. **A.** Detalle de la morfología celular. Barra: 10  $\mu$ m. **B y C.** Proliferación masiva de agregados de células neoplásicas en branquia (**B**) y riñón (**C**). Barra en B (válida también para C): 50  $\mu$ m.

#### IV.4.1.2. Estudio ultraestructural mediante MET

Para su estudio ultraestructural se aislaron células neoplásicas típicas (tipo A) a partir de hemolinfa y células neoplásicas tipo B a partir de tejidos de la masa visceral de berberecho. Ambos tipos celulares presentaron una forma entre redondeada y oval, un perímetro caracterizado por la ausencia de pseudópodos y un tamaño mayor que los hemocitos normales (Figura IV.8A). La ultraestructura de ambos tipos de células neoplásicas fue similar, difiriendo fundamentalmente en que las células neoplásicas de tipo A presentaban un tamaño mayor, grandes núcleos pleomórficos con forma normalmente arrañada y en numerosas ocasiones con invaginaciones citoplasmáticas en su interior (Figura IV.8B y C). El tipo B presentaba normalmente un tamaño menor y un núcleo redondo centrado con un nucleolo claramente definido (Figuras IV.8A y IV.9A). El contorno nuclear estaba claramente definido en ambos tipos, la cromatina

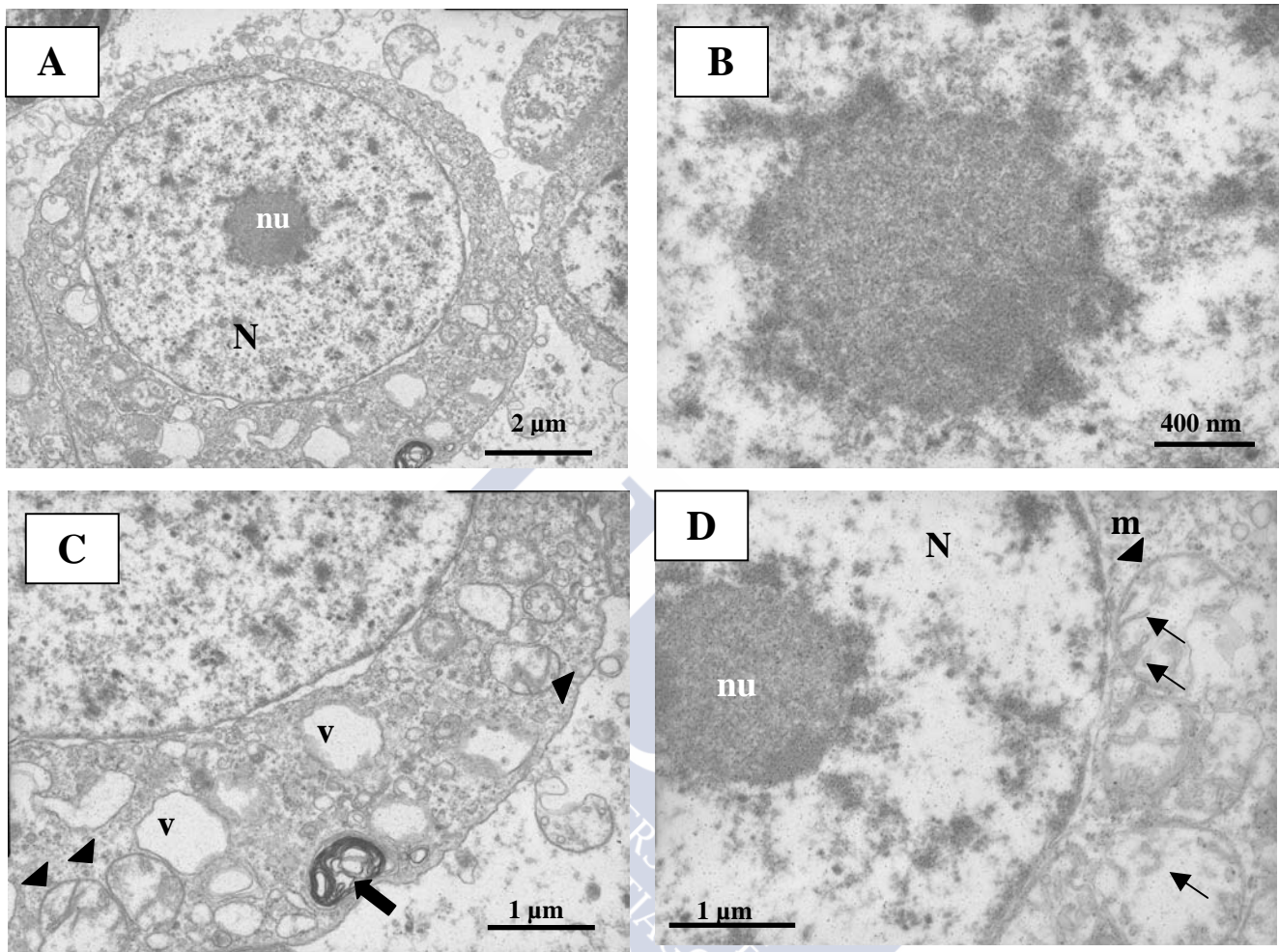
aparecía dispersa en pequeños agregados y, normalmente, se observó un único nucleolo hipertrofiado en el que se distinguía una segregación de sus componentes según zonas de diferentes densidad (Figuras IV.8B, IV.9A y detalle en IV.9B).



**Figura IV.8.A-C:** Microfotografías de células neoplásicas aisladas a partir de hemolinfa y observadas mediante MET **A.** Células circulantes en hemolinfa de berberecho: hemocito normal (hn) con pseudópodos (p) y dos células neoplásicas diferentes: típica (punta de flecha) y otra (flecha negra) posiblemente correspondiente a un estado intermedio en transición, tal vez correspondiente a una célula neoplásica tipo B. **B.** Célula neoplásica aislada a partir de hemolinfa con núcleo arriñonado (N) y nucleolo muy patente (nu). Las puntas de flecha muestran mitocondrias. **C.** Célula neoplásica típica con núcleo pleomórfico e invaginación citoplasmática (asterisco) en su interior.

La variedad de orgánulos celulares observados en el escaso citoplasma era muy pobre, distinguiéndose únicamente abundantes vesículas y vacuolas, así como estructuras multivesiculares formadas por sistemas de membranas dispuestas de forma concéntrica y que parecían figuras de mielina (Figura IV.9C). Se observaron también mitocondrias que, por su tamaño y por la apariencia interna de sus crestas mitocondriales, parecían estar hinchadas (Figuras IV.8B y IV.9C y D).





**Figura IV.9:** Microfotografías mediante MET de células neoplásicas tipo B obtenidas a partir de tejido conjuntivo de masa visceral. **A.** Célula neoplásica tipo B en tejido conjuntivo (N: núcleo; nu: nucleolo). **B.** Detalle de nucleolo de célula neoplásica constituido por componentes de diferente densidad. **C.** Orgánulos celulares presentes en el citoplasma: v, vacuolas; flecha: figuras de mielina; puntas de flecha: mitocondrias. **D.** Detalle ultraestructural de zona limítrofe núcleo – citosol de célula neoplásica, en la que se aprecian las mitocondrias (m) de aspecto hinchado con sus crestas (flechas). N: núcleo; nu: nucleolo; m: mitocondria.

#### **IV.4.2. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA**

Con la técnica de FC, las células neoplásicas y los hemocitos, observados al microscopio óptico presentaban un contorno claro con un núcleo púrpura claramente identificable y un citoplasma de color azul pálido (Figura IV.10A). Tanto los hemocitos como las células neoplásicas aparecían aplastadas y con un tamaño mayor que en el resto de técnicas, debido al efecto de la fuerza centrífuga inherente al proceso de centrifugación. Las células neoplásicas fueron perfectamente distinguibles de los hemocitos por su tamaño claramente mayor, por su mayor relación núcleo/citoplasma y por presentar en general una intensidad tintorial mayor.

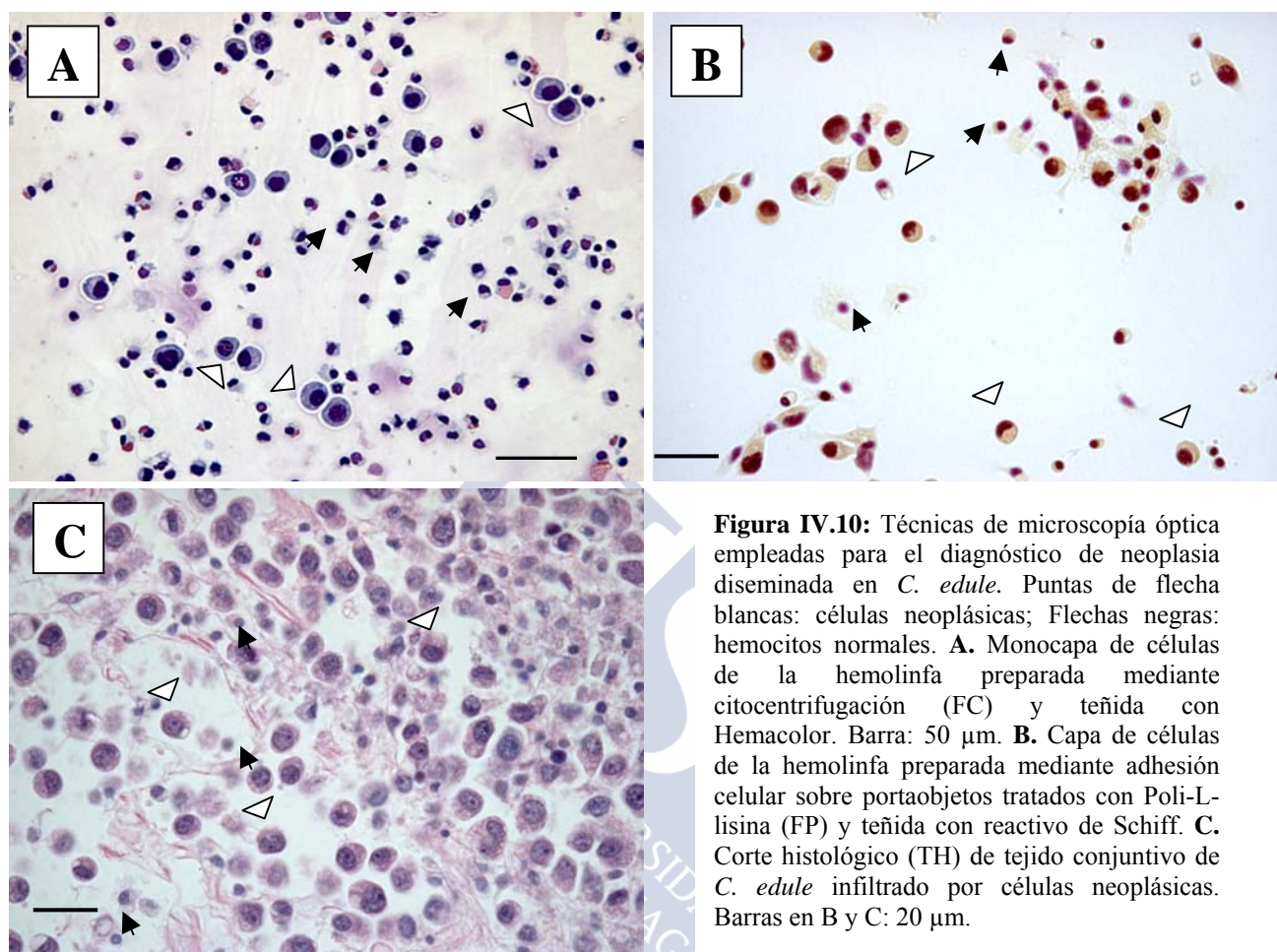
En las preparaciones de FP el contorno celular no fue tan claramente distinguishible debido a que las células se adhieren de forma espontánea y el citoplasma se extiende sobre el portaobjetos adquiriendo menor espesor. El núcleo adquirió un color rojo oscuro, siendo el nucleolo distinguishible en muchos casos por un color rojo más brillante. El citoplasma se tiñó muy débilmente con un color entre crema y amarillo pálido, lo que también contribuye a la dificultad de distinción del contorno celular. Las células neoplásicas se diferenciaron fácilmente de los hemocitos por su mayor tamaño, su gran relación núcleo/citoplasma y su forma claramente redondeada debido a su incapacidad para emitir pseudópodos (Figura IV.10B).

En el caso de los cortes histológicos (TH) las células neoplásicas respondían a la descripción dada en el apartado IV.4.1.1, presentando un grado mayor o menor de colonización de los tejidos según el nivel de desarrollo de la enfermedad (Figura IV.10C).

##### **IV.4.2.1. Sensibilidad de diagnóstico**

La observación al microscopio óptico de las preparaciones realizadas según las tres técnicas (FC, FP y TH) comparadas en primer lugar, permitió diagnosticar, por al menos una de las técnicas empleadas, un total de 32 berberechos afectados por neoplasia de 116 analizados (Tabla IV.1 y 2). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de berberechos neoplásicos detectado entre diferentes técnicas ( $S=5,64$ ;  $GL=2$ ;  $P=0,060$ ), aunque el resultado estuvo muy próximo al límite de significación ( $P\leq 0,05$ ). Ninguna de las técnicas detectó todos los casos de neoplasia pero, en números absolutos, la técnica más sensible en cada una de las muestras fue la

FP (Tabla IV.1). Acumulando las tres muestras, la FP fue también la técnica más sensible, seguida por la TH y por último la FC (Tablas IV.1 y 2).



**Tabla IV.1:** Sensibilidad de 3 técnicas diferentes de diagnóstico de neoplasia diseminada en berberecho *C. edule* mediante microscopía óptica. FC: frotis mediante citocentrifugación; FP: frotis Poli-L-lisina; TH: técnica histológica.

Técnica de diagnóstico	Muestras			Total
	Junio 1999	Julio 1999	Noviembre 1999	
FC	8/10	11/13	6/9	25/32 (78,1 %)
FP	9/10	13/13	9/9	31/32 (96,9 %)
TH	9/10	12/13	8/9	29/32 (90,6 %)

**Tabla IV.2:** Intensidad de neoplasia diseminada. Diagnóstico de los berberechos analizados en el estudio de comparación de 3 técnicas de diagnóstico de neoplasia diseminada en *C. edule*. FC: frotis mediante citocentrifugación; FP: frotis Poli-L-lisina; TH: técnica histológica. Escala de intensidad FC y FP: 0, ausencia neoplasia; 1: neoplasia ligera; 2: neoplasia moderada; 3: neoplasia intensa. Escala de Mix (1983) modificada en la TH: 5 estados (0 a 4 según gradiente de intensidad creciente).

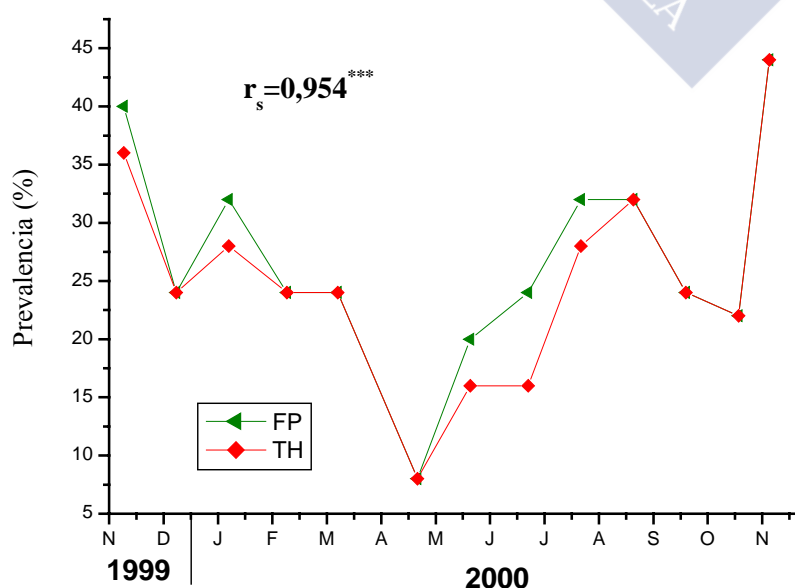
Junio 1999				Julio 1999				Noviembre 1999			
Código	FC	FP	TH	Código	FC	FP	TH	Código	FC	FP	TH
1	0	0	0	47	0	0	0	93	0	0	0
2	0	0	0	48	0	0	0	94	0	0	0
3	0	0	0	49	0	0	0	95	0	0	0
4	0	0	0	50	0	0	0	96	3	3	4
5	0	0	0	51	0	0	0	97	0	1	1
6	2	3	3	52	1	1	1	98	1	1	1
7	1	2	2	53	0	0	0	99	0	0	0
8	0	0	0	54	0	0	0	100	2	3	3
9	0	0	0	55	0	0	0	101	0	0	0
10	0	0	0	56	0	0	0	102	2	2	1
11	0	1	0	57	0	0	0	103	0	1	1
12	1	2	1	58	3	3	4	104	0	0	0
13	0	0	0	59	1	1	1	105	0	0	0
14	0	0	0	60	0	0	0	106	0	0	0
15	0	0	0	61	0	0	0	107	0	1	0
16	3	3	4	62	0	1	1	108	0	0	0
17	0	0	1	63	0	0	0	109	0	0	0
18	0	0	0	64	3	3	4	110	3	3	3
19	0	0	0	65	0	0	0	111	0	0	0
20	3	3	4	66	0	0	0	112	0	0	0
21	2	3	4	67	0	1	0	113	0	0	0
22	0	0	0	68	0	0	0	114	1	1	1
23	0	0	0	69	3	3	4	115	0	0	0
24	1	1	1	70	3	3	4	116	0	0	0
25	0	0	0	71	0	0	0				
26	0	0	0	72	0	0	0				
27	0	0	0	73	1	1	1				
28	0	0	0	74	0	0	0				
29	0	0	0	75	0	0	0				
30	1	2	3	76	0	0	0				
31	0	0	0	77	0	0	0				
32	0	0	0	78	0	0	0				
33	0	0	0	79	0	0	0				
34	0	0	0	80	3	3	4				
35	0	0	0	81	0	0	0				
36	0	0	0	82	0	0	0				
37	0	0	0	83	0	0	0				
38	0	0	0	84	0	0	0				
39	0	0	0	85	0	0	0				
40	0	0	0	86	0	0	0				
41	0	0	0	87	3	3	4				
42	0	0	0	88	3	3	4				
43	0	0	0	89	3	3	3				
44	0	0	0	90	0	0	0				
45	0	0	0	91	0	0	0				
46	0	0	0	92	0	0	0				



En el estudio de análisis de la evolución de la prevalencia de neoplasia diseminada en el banco de *Misela*, el diagnóstico se realizó empleando FP y TH (Tabla IV.3). En este caso sí se detectaron diferencias significativas entre técnicas ( $S= 5,00$ ;  $GL= 1$ ;  $P= 0,025$ ), constatándose una vez más la FP como más sensible que la TH al detectar la totalidad de los casos de neoplasia. Aunque la mayor sensibilidad de la FP determina valores de prevalencia mayores que la TH en algunos de los meses (Figura IV.11), existe una muy buena correlación significativa entre los patrones definidos mediante ambas técnicas ( $r_s= 0,954$ ,  $P= 0,000$ ).

**Tabla IV.3:** Sensibilidad de las técnicas FP (frotis Poli-L-lisina) y TH (histología) en el diagnóstico de neoplasia diseminada en berberecho *C. edule* en el transcurso de un estudio de evolución temporal de la enfermedad en el banco natural de *Misela*.

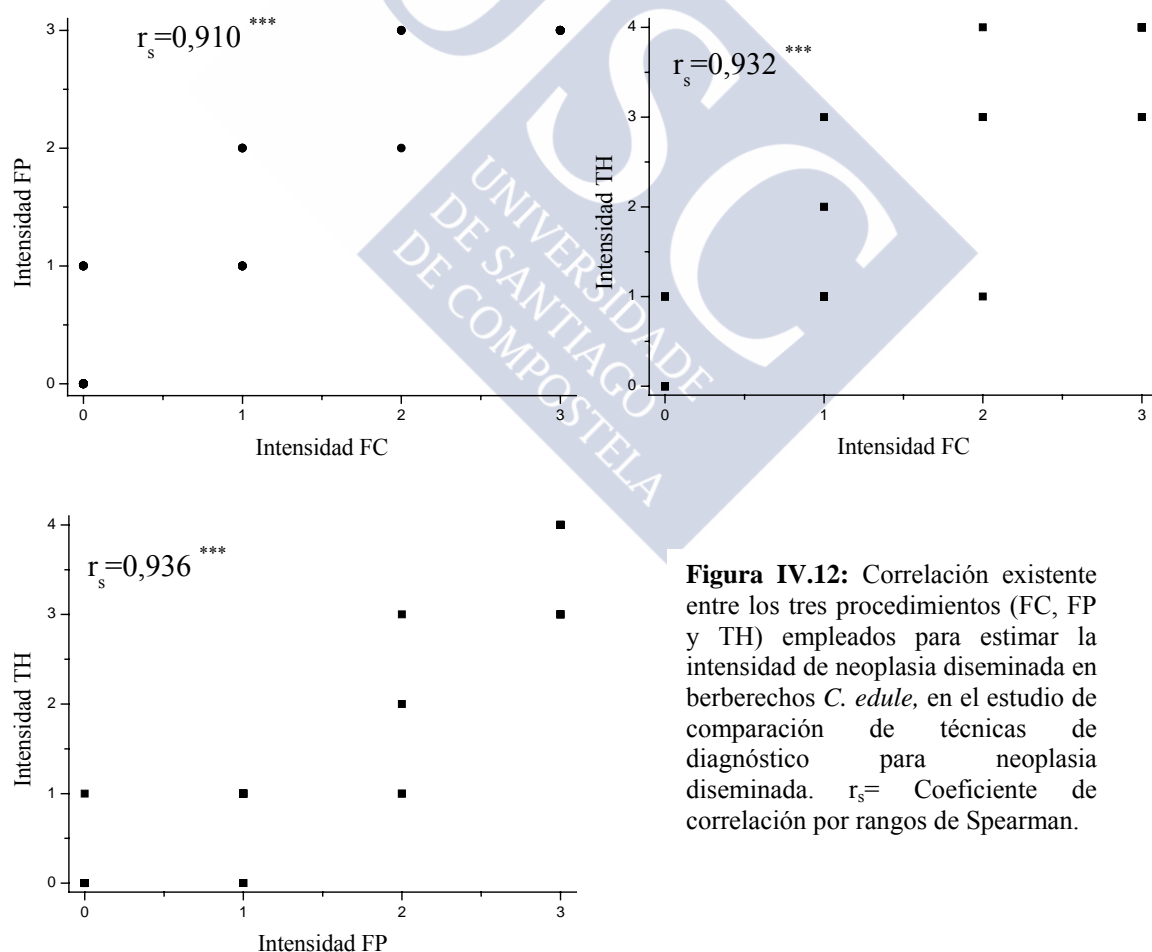
Técnica de diagnóstico	FECHA													TOTAL
	23/11/99	22/12/99	20/01/00	21/02/00	20/03/00	03/05/00	01/06/00	03/07/00	01/08/00	30/08/00	28/09/00	27/10/00	13/11/00	
TH	9/10	6/6	7/8	6/6	6/6	2/2	4/5	4/6	7/8	8/8	6/6	5/5	11/11	81/87 (93.1 %)
FP	10/10	6/6	8/8	6/6	6/6	2/2	5/5	6/6	8/8	8/8	6/6	5/5	11/11	87/87 (100 %)



**Figura IV.11:** Evolución temporal de la prevalencia de la neoplasia diseminada detectada en berberechos de *Misela* según dos técnicas diferentes de diagnóstico de la enfermedad: FP (frotis poli-L-lisina) y TH (histología).  $r_s$ = Coeficiente de correlación por rangos de Spearman.

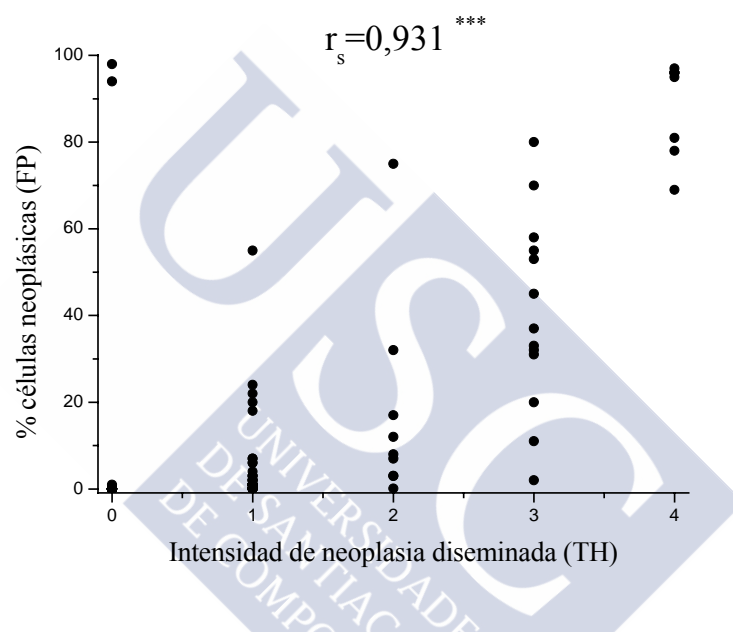
#### IV.4.2.2. Estimación de la intensidad de la neoplasia diseminada

La Tabla IV.2 muestra la correspondencia existente entre la intensidad de neoplasia estimada en la comparación de las técnicas de diagnóstico FC, FP y TH. La correlación entre los distintos procedimientos fue muy elevada y altamente significativa estadísticamente (FP vs. FC:  $r_s=0,910$ ,  $P=0,000$ ; TH vs. FC:  $r_s=0,932$ ,  $P=0,000$ ; TH vs. FP:  $r_s=0,936$ ,  $P=0,000$ ; Figura IV.12). Cabe mencionar que con la técnica FP no se detectó un 3,1 % (1/32) de los berberechos afectados, con la FC pasaron desapercibidos un 21,9 % (7/32) de los berberechos afectados y con la TH un 9,4 % (3/32), si bien se trataba de casos de neoplasia ligera, siendo detectados todos los casos de neoplasia moderada e intensa por las tres técnicas.



**Figura IV.12:** Correlación existente entre los tres procedimientos (FC, FP y TH) empleados para estimar la intensidad de neoplasia diseminada en berberechos *C. edule*, en el estudio de comparación de técnicas de diagnóstico para neoplasia diseminada.  $r_s$ = Coeficiente de correlación por rangos de Spearman.

En el estudio epizootiológico realizado en *Misela*, el porcentaje de células neoplásicas contabilizado en FP y la intensidad estimada con TH presentaron una correlación muy elevada ( $r_s=0,931$ ,  $P=0,000$ ), tal y como se evidencia en la Figura IV.13.



**Figura IV.13:** Correlación existente entre los dos procedimientos empleados para la estimación de la intensidad de la neoplasia diseminada en berberechos *C. edule* correspondientes al seguimiento temporal de la dinámica de la neoplasia en *Misela* (Ría de Noia). El porcentaje de células neoplásicas se contabilizó en FP y la escala con cinco estados de intensidad se aplicó sobre preparaciones histológicas (TH).  $r_s$ = Coeficiente de correlación por rangos de Spearman.

## IV.5. DISCUSIÓN

### Caracterización de la neoplasia

La caracterización morfológica ha permitido distinguir dos tipos de células neoplásicas, tipos A y B. En algunos casos minoritarios se observó cierta capacidad defensiva por parte de los hemocitos contra estas células neoplásicas, observación que coincide con el fenómeno de remisión de la enfermedad en casos de intensidad ligera descrito previamente en otras especies (Elston *et al.* 1988a). Las características histopatológicas correspondientes a la neoplasia tipo A coinciden con las neoplasias descritas en berberechos de Irlanda (Twomey & Mulcahy 1984) y de la Bretaña francesa (Poder & Auffret 1986). El tipo B de células neoplásicas fue descrito por Carballal *et al.* (2001) en su estudio de parásitos y alteraciones patológicas que afectaban a las poblaciones de berberecho de Galicia.

Con respecto a las características ultraestructurales de las células neoplásicas presentes en berberechos gallegos, éstas denotan un escaso grado de diferenciación celular al presentar una variedad muy pobre de orgánulos citoplasmáticos, propios de células anaplásicas (Mix *et al.* 1979; Auffret & Poder 1986; Elston *et al.* 1992). Los dos tipos de células neoplásicas observadas presentan características ultraestructurales similares, difiriendo fundamentalmente en su tamaño y en el grado de polimorfismo nuclear. La presencia de un núcleo grande polimórfico, de esférico a arriñonado y en ocasiones con invaginaciones celulares, fue propio de las células neoplásicas de tipo A y concuerda con las descripciones ultraestructurales de células neoplásicas que afectan a *Macoma balthica* (Farley 1976), y a *Mytilus edulis* (Mix *et al.* 1979; Green & Alderman 1983; Rasmussen 1986a). Auffret y Poder (1986) no describen en berberechos de la Bretaña francesa un grado de polimorfismo nuclear tan elevado como en *M. edulis* hecho que podría deberse a que en los berberechos analizados por estos autores preponderase el tipo celular que nosotros denominamos como B en los berberechos gallegos. La distribución de la cromatina en pequeños agregados y la presencia de un nucleolo hipertrofiado integrado por componentes de diferente densidad a los electrones se corresponde con la separación de componentes fibrilares y granulares descrita por Auffret y Poder (1986). Las mitocondrias de tamaño grande, probablemente hinchadas, son también una observación ultraestructural corriente en células neoplásicas de diferentes moluscos bivalvos (Farley 1976; Mix *et al.* 1979; Green & Alderman 1983; Rasmussen 1986a; Auffret & Poder 1986), así como las estructuras multivesiculares

que se asemejan a vainas de mielina (Farley 1976; Mix *et al.* 1979; Auffret & Poder 1986). Estas características coinciden con las de células neoplásicas típicas de vertebrados (Mix *et al.* 1979).

La existencia de dos tipos de células neoplásicas ha sido descrita anteriormente en otras especies de moluscos bivalvos: *Mytilus edulis* de Plymouth, Reino Unido (Lowe & Moore 1978), *M. edulis* de Oregon, Estados Unidos (Mix *et al.* 1979), *M. edulis* de Puget Sound, Estados Unidos (Moore *et al.* 1991), *Mya arenaria* (Brown *et al.* 1976), y *Ostreola conchaphila* de Oregon (Mix, 1975). La presencia de dos tipos celulares neoplásicos puede deberse, bien a la existencia de diferentes estadios de desarrollo celular dentro de una misma línea de células neoplásicas o bien a la existencia de líneas celulares diferentes (Elston *et al.* 1992).

En el caso de los berberechos gallegos la dinámica de proliferación celular de la neoplasia siguió patrones diferentes en ambos tipos celulares en función de los tejidos y órganos en los que se detectó cada tipo. El primer tipo celular fue observado en sus estadios iniciales de proliferación en las inmediaciones del sistema digestivo y senos de la hemolinfa de la masa visceral, migrando progresivamente y extendiéndose al resto de tejidos conforme incrementaba el nivel de intensidad de la neoplasia. El segundo tipo celular (tipo B) parecía tener su origen en la branquia extendiéndose a continuación hacia el tejido conjuntivo de la masa visceral hasta alcanzar niveles sistémicos de afectación. Hasta el momento no se conocen con certeza los tejidos de los cuales se derivan las células neoplásicas. Se ha hipotetizado sobre diferentes tejidos específicos de origen, como células mesenquimales indiferenciadas, células madre hematopoyéticas o tejido conjuntivo vesicular indiferenciado (Elston *et al.* 1992). A las neoplasias de berberecho registradas en Irlanda y Francia se les ha atribuido un posible origen hemocitario (Twomey & Mulcahy 1984; Poder & Auffret 1986), lo cual concuerda con las observaciones del primer tipo de neoplasia descrito. Christensen *et al.* (1974) describen en *Macoma balthica* de Chesapeake Bay un tipo de neoplasia invasivo que parece tener su origen en el epitelio branquial. Estas observaciones se adecuan más al patrón de proliferación de las células neoplásicas tipo B detectadas en berberecho. Sin embargo, atendiendo a la caracterización citológica de las células neoplásicas mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión, parece que por su tamaño y ultraestructura celular, el tipo B podría ser un estadio intermedio de una línea celular que finalizaría en un grado de desorganización y degeneración celular máximo correspondiente al morfotipo de célula neoplásica tipo A. En este aspecto el examen

ultraestructural constituye una herramienta sólida para la realización del diagnóstico de la neoplasia pero apenas aporta información que contribuya al conocimiento de los tejidos de origen, patogénesis y etiología de la misma (Elston *et al.* 1992). Atendiendo a esta información contradictoria, la cuestión de si las poblaciones de berberecho de Galicia realmente se encuentran afectadas por dos tipos diferentes de neoplasia, o bien si se trata de dos tipos celulares correspondientes a una única línea celular, no ha podido ser resuelta en el presente trabajo. Para dilucidar esta cuestión se requieren estudios ulteriores aunque la baja prevalencia con que aparecen las células neoplásicas de tipo B constituye un serio condicionante.

De manera genérica, la caracterización de la neoplasia detectada en berberechos gallegos confirma la similitud existente en la citología y patología de esta condición entre diferentes grupos de moluscos bivalvos (como son ostras, mejillones y almejas), resultando estas similitudes bastante destacables considerando la distancia taxonómica existente entre dichos grupos y el amplio rango de extensión geográfica en el que dicha patología ha sido descrita (Elston *et al.* 1992).

### **Comparación de técnicas de diagnóstico de neoplasia**

Se llevó a cabo la comparación de tres técnicas de diagnóstico de neoplasia diseminada mediante microscopía óptica: dos técnicas hemocitológicas (FP y FC) y una técnica histológica (TH) clásica. Aunque cada una de las técnicas ensayadas dio algún falso negativo, los resultados indican que la técnica hemocitológica basada en la adhesión espontánea de células de la hemolinfa sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina y teñidos con reactivo de Schiff (técnica FP), es más sensible que los frotis preparados mediante citocentrifugación y que las preparaciones histológicas (TH). De manera general para todas las técnicas, aquellos casos de neoplasia que fueron detectados por alguno de los procedimientos pero no por los otros, fueron neoplasias de intensidad ligera. En estados de baja intensidad de la enfermedad, la identificación de células neoplásicas puede complicarse por la presencia de células raras, de similar apariencia pero no neoplásicas y de origen y función desconocida (Mix 1975; Smolowitz *et al.* 1989). Así, diagnósticos falso-positivos debido a estas células pueden tener lugar con cualquiera de las técnicas basadas en la morfología celular (Elston *et al.* 1992). Existe cierto desacuerdo en cuanto a qué aproximación (histológica o hemocitológica) es más precisa a la hora de detectar la neoplasia. Cooper *et al.* (1982a) encuentran que la hemocitología revela sólo entre un 61 y un 71% de los casos de nivel



1 (ligeros), mientras que Farley *et al.* (1986) encuentran que la hemocitología es más sensible que la histología detectando casos tempranos. En el presente estudio se dieron ambos casos, existiendo un caso detectado por la TH y no por la FP, y varios casos de neoplasias detectadas por la FP pero no por la TH y/o FC. En la práctica la sensibilidad del examen histológico y hemocitológico es función de la proporción de tejido y de hemolinfa examinados (Elston *et al.* 1992; Barber 2004). De esta forma el caso detectado mediante TH y no por FP, pudo deberse bien a que se trataba de un tumor localizado que no liberó todavía células neoplásicas hacia la hemolinfa circulante, o bien a que el volumen de hemolinfa analizado fue escaso para la detección de dichas células neoplásicas en circulación. Aquellos casos donde la enfermedad fue detectada mediante FP y no por TH, podrían deberse a algún tumor localizado que no fue recogido en el corte histológico estudiado pero que ya había liberado células neoplásicas a la hemolinfa. A su vez los casos detectados por FP y no por FC pueden ser debidos a que –aún siendo ambas técnicas basadas en extracciones de hemolinfa- realmente la FC utiliza cantidades menores de hemolinfa, lo cual se traduce en un menor número de células en las preparaciones de FC.

La elección de la técnica más adecuada dependerá de los objetivos del diagnóstico. La TH proporciona un marco de referencia para comparar los tejidos afectados con respecto a los sanos, además las células anormales en circulación pueden ser estudiadas en el contexto de los tejidos circundantes (grado de desarrollo gonadal, presencia de otros parásitos y patologías). La TH también proporciona información de la progresión de la enfermedad (gravedad, intensidad) en relación a los distintos tejidos (Mix 1983), y de procesos tales como la remisión de la enfermedad (Elston *et al.* 1988a). Las principales desventajas de la TH son su precio relativamente elevado y el tiempo consumido en su procesamiento. La principal ventaja de las técnicas hemocitológicas es la relativa velocidad a la que se puede examinar un número de animales relativamente grande (Farley *et al.* 1986; Farley *et al.* 1991), además de que son técnicas no destructivas y los individuos pueden ser muestreados repetidamente sin que afecte a su supervivencia (Brown *et al.* 1977; Cooper *et al.* 1982a). Este enfoque ha permitido estudios de seguimiento del avance de la enfermedad, el cálculo de tasas de mortalidad según el grado de afectación por neoplasia y la selección de organismos para experiencias (Elston *et al.* 1992; Barber 2004).

En el caso del desarrollo de estudios epizootiológicos enfocados hacia la gestión de poblaciones naturales los resultados del presente estudio sugieren que lo más

recomendable es el empleo combinado de la técnica FP, para disponer de un primer diagnóstico rápido y preciso, y de la TH, para completar el diagnóstico con información complementaria.



**V. ESTUDIO DE UNA NEOPLASIA DISEMINADA  
EN EL BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE  
LA COSTA DE GALICIA (II)**

**ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS Y EFECTOS  
SOBRE LA CONDICIÓN DEL HOSPEDADOR**

---

UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA



## **V. ESTUDIO DE UNA NEOPLASIA DISEMINADA EN EL BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA (II). ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS Y EFECTOS SOBRE LA CONDICIÓN DEL HOSPEDADOR**

### **V.1. RESUMEN**

A lo largo de los años 1999 y 2000 se llevó a cabo un seguimiento de la prevalencia e intensidad de la neoplasia diseminada en dos poblaciones naturales de berberecho: *Misela*, en la Ría de Noia, y *Lombos do Ulla*, en la Ría de Arousa, con el fin de conocer la dinámica temporal de la enfermedad. La neoplasia presentó niveles epizooticos en ambos bancos a lo largo de todo el período estudiado. Se observó un patrón general de prevalencia cíclico y bimodal, caracterizado por presentar dos máximos anuales de prevalencia (uno a final de primavera - principio de verano, y otro en otoño tardío - principio de invierno) y valores menores durante el invierno y al final del verano - principio de otoño. No se observó relación alguna entre la evolución de la enfermedad y la temperatura del mar y del aire, la salinidad y la concentración de clorofila *a* registradas en *Misela* durante el período de estudio. Lo mismo se verificó en la población de *Lombos do Ulla*, salvo en el caso de la salinidad, donde existió una correlación clara entre el descenso de la salinidad, debido a fuertes precipitaciones, y el incremento de la prevalencia de la enfermedad por la aparición de nuevos casos de neoplasia diseminada. Se intentó la evaluación de la mortalidad de berberecho en el banco de *Misela* pero no fue posible hacerlo con rigor; se comprobó, sin embargo, la existencia de cierta correlación significativa entre la intensidad media de afectación por neoplasia y el número de berberechos que aparecían muertos sobre el sustrato por metro cuadrado, lo cual parece indicar que la neoplasia puede ser responsable de cierta mortalidad apreciable a nivel poblacional. La prevalencia de la enfermedad fue claramente mayor entre los individuos adultos (1-2 años de edad), de talla comercial, que en los berberechos juveniles correspondientes al reclutamiento del año en curso. En cuanto a los efectos fisiológicos de la neoplasia, se observó una disminución en el índice de condición y en el peso seco de los tejidos en los berberechos afectados por niveles máximos de intensidad de neoplasia (categoría 4 de intensidad) con respecto a los individuos sanos. Esta disminución, sin embargo, no resultó estadísticamente significativa.

## SUMMARY

A monitoring study of the prevalence and intensity of disseminated neoplasia was developed during 1999 and 2000 in two different cockle populations: *Misela* and *Lombos do Ulla*. Epizootic levels of neoplasia were detected during all the study in both cockle populations. Prevalence presented a cyclical bimodal pattern with two annual peaks (the first in late spring – early summer, and the other in late autumn – early winter) and minimum values during the winter and late summer – early autumn. There were not detected any relationship between the progression of disseminated neoplasia and air and seawater temperature, salinity and chlorophyll *a* concentrations in *Misela*. In cockles from *Lombos do Ulla* there were detected an inverse significant correlation between disseminated neoplasia prevalence and salinity. Disseminated neoplasia could be responsible of certain mortality since a significant correlation was detected between neoplasia mean intensity and the number of cockles recently death observed unburied under the seafloor. Prevalence of neoplasia was higher in adult cockles (1-2 years old), of commercial size (length >28 mm), respecting to juvenile cockles (<1 year old). Cockles affected by high intensity neoplasias had lower condition index and dry tissue weight than unaffected cockles, but these differences there were not statistically significant.



## V.2. INTRODUCCIÓN

Se han descrito con anterioridad enfermedades de tipo neoplásico en berberechos de Irlanda (Twomey & Mulcahy 1984) y de la Bretaña francesa (Poder & Auffret 1986), y se han relacionado con mortalidad en ésta (Twomey & Mulcahy 1988b) y otras especies de moluscos bivalvos (Barber 2004). Desde el momento en que la neoplasia puede causar mortalidad, es de prever impactos potenciales sobre las poblaciones de bivalvos que resulten afectados por la misma. En este sentido, Cooper (1979) estima que la neoplasia diseminada es responsable de una mortalidad anual de entre el 15 y el 20 % en las poblaciones de *Mya arenaria* de Allen Harbour en Rhode Island (Estados Unidos); y Appeldoorn *et al.* (1984) citan reducciones del 20 % en la producción de esta misma especie en la costa atlántica norteamericana, como consecuencia del desarrollo de enfermedades de naturaleza neoplásica.

Los estudios epizootiológicos contemplan la distribución, abundancia e incidencia de las enfermedades; así como otros aspectos relacionados con la extensión de las mismas, como son la influencia de los factores ambientales y las interacciones entre agente causal y hospedador (Kinne 1980). Los resultados de este tipo de estudios son fundamentales en el desarrollo de métodos para el control y la prevención de enfermedades en el ámbito de la maricultura (McVicar 1990).

En el trabajo de cartografía de los principales parásitos y alteraciones patológicas de las poblaciones de berberecho de Galicia (capítulo III) se determinaron aquellas zonas del litoral gallego libres y afectadas por neoplasia diseminada, tarea fundamental para evitar la extensión de enfermedades (OIE 2002). Para poder avanzar en el conocimiento de la dinámica y de los efectos de la neoplasia se requiere información acerca de la evolución temporal de la prevalencia e incidencia de la misma en las poblaciones afectadas, así como de las variables ambientales en las que se desarrollan dichas poblaciones. Asimismo los efectos fisiológicos de la enfermedad sobre el hospedador determinarán el grado de patogenicidad de la misma y contribuirán a explicar los patrones de evolución de la neoplasia.

Por todo lo expuesto anteriormente en el presente capítulo se abordará: (i) el patrón de variación temporal de la neoplasia; (ii) la posible influencia de diferentes parámetros ambientales en el desarrollo de la enfermedad; (iii) la incidencia de la enfermedad en relación con la edad de los berberechos; (iv) la evaluación de los

posibles efectos que la neoplasia puede acarrear con trascendencia para la explotación comercial del berberecho: mortalidad y reducción en el rendimiento en carne de los berberechos afectados. Otros aspectos de esta patología directamente relacionados con la reproducción (como son el efecto del sexo en la susceptibilidad, la reducción de la capacidad reproductora...), se abordarán de manera conjunta con otras patologías en el capítulo IX de esta memoria.

### **V.3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **V.3.1. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA NEOPLASIA DISEMINADA**

##### **V.3.1.1. Variación temporal**

A lo largo de los años 1999 y 2000 se llevó a cabo un seguimiento temporal de la afectación por neoplasia diseminada en dos poblaciones naturales de berberecho, caracterizadas por presentar producciones muy importantes y al mismo tiempo por haberse detectado en las mismas niveles epizooticos de neoplasia diseminada en la cartografía previa expuesta en el capítulo III. Estos bancos fueron (Figura IV.1): *Misela*, en la Ría de Noia; y *Lombos do Ulla*, en la Ría de Arousa. El diseño inicial del estudio epizootiológico contemplaba un período de seguimiento de un mínimo de 3 años. Sin embargo, la severidad del invierno del año 2000, caracterizado por elevadas precipitaciones que originaron descensos de la salinidad hasta valores en torno al 4 ‰, causó mortalidades masivas de moluscos bivalvos en los bancos de *Misela* y *Lombos do Ulla*, e impidió la continuidad de las labores de muestreo en los mismos. En la población natural intermareal de *Misela* se recogieron mediante el empleo de calicatas (ver sección V.3.1.4), lotes de 25 berberechos de talla comercial ( $L > 28$  mm) con periodicidad mensual, entre abril de 1999 y noviembre de 2000. Se tomaron también muestras mensuales de las mismas características, entre noviembre de 1999 y noviembre de 2000, en el banco submareal de *Lombos do Ulla*. Debido al carácter submareal de esta población las muestras fueron recolectadas empleando el arte de marisqueo conocido como *raño* o *gancha*, y que consiste en un rastro con dientes y copo metálicos y que se manipula por una persona desde una embarcación, por medio de un largo mango. Estas muestras se procesaron mediante técnicas histológicas y fueron examinadas al microscopio óptico, caracterizando el grado de intensidad de

neoplasia diseminada mediante la escala, modificada de la de Mix (1983), descrita previamente en el apartado IV.3.2.7. Debido a la baja prevalencia con que se detectó la neoplasia tipo B y a que no estaba claro si se trataba de un tipo de neoplasia diferente o bien de un estadio de desarrollo celular intermedio dentro de la misma línea de células neoplásicas, se optó por no incluir aquellos berberechos afectados por este segundo tipo de neoplasia en el presente estudio. Con carácter mensual, y para cada una de las poblaciones estudiadas, se calculó la prevalencia de neoplasia diseminada como el porcentaje de individuos muestreados afectados por la enfermedad y la intensidad media poblacional de afectación por neoplasia. Esta última es un índice ponderado, que refleja el porcentaje de individuos presente en cada una de las categorías de intensidad de neoplasia consideradas (0, 1, 2, 3, 4), y que responde a la siguiente expresión (modificación de la empleada por Andrews & Hewatt 1957 para *Perkinsus* sp.):

$$\text{Intensidad media de neoplasia} = [(n_1 \times 1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3) + (n_4 \times 4)] / N$$

Donde:

$n_i$  = número de casos clasificados como (i)

(i) = categorías de intensidad de neoplasia diseminada

N = número total de berberechos examinados en la muestra

El índice varía entre 0 y 4, donde 0 indicaría que todos los individuos analizados están libres de la enfermedad; y 4, que todos los berberechos están afectados por neoplasia en su mayor grado de intensidad.

Con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas, en la dinámica de la neoplasia diseminada entre ambos bancos, se realizaron tests no paramétricos de Friedman, en los que las variables analizadas fueron la prevalencia y la intensidad media poblacional de neoplasia, los tratamientos fueron los bancos estudiados y los bloques los constituyeron los diferentes períodos de muestreo.

### V.3.1.2. Correlación con variables ambientales

Se evaluó la correlación entre el desarrollo de neoplasia diseminada y determinadas variables ambientales registradas en los años 1999 y 2000. Se emplearon los valores de temperatura, salinidad y concentración de clorofila *a* en la capa superficial (primeros 1,5 m de la columna de agua), procedentes de las estaciones de la red de control de condiciones oceanográficas del *Instituto Tecnológico para el Control de Medio Mariño de Galicia* (INTECMAR) más próximas a los bancos de berberecho estudiados (*M3*: salinidad y temperatura, y *M7*: concentración de clorofila, para el caso de *Misela*; y *A3*, para *Lombos do Ulla*). Por problemas de calibración de las sondas del CTD no se dispuso de registros de salinidad y temperatura en la estación *M3* correspondientes a los meses de enero y febrero de 2000; ni del período noviembre de 1999 a febrero de 2000, para el caso de la estación *A3*. Se consideraron también la temperatura media del aire y la precipitación mensual acumulada, registradas en las estaciones de Noia y Vilagarcía del *Instituto Nacional de Meteorología* (INM), próximas a los bancos de *Misela* y *Lombos do Ulla*, respectivamente. Para todas estas variables se computó el promedio correspondiente a los registros existentes entre fechas de muestreo, y se calcularon coeficientes de correlación por rangos de Spearman entre dichos valores y los de prevalencia e intensidad media poblacional mensual de neoplasia diseminada en ambos bancos.

### V.3.1.3. Mortalidad

En *Misela*, entre mayo de 1999 y noviembre de 2000, se tomaron mensualmente siempre en la misma ubicación (N 42° 47', W 8° 55'), entre 10 y 20 muestras de sedimento al azar, empleando calicatas de 25 cm de diámetro (0,05 m<sup>2</sup>) y profundizando entre 10 y 15 cm en el sustrato. Este sedimento fue tamizado a través de una malla metálica de 5 mm de luz de malla, y todos los berberechos (vivos y muertos) retenidos fueron transportados al laboratorio donde se realizó el recuento de los mismos y se determinó su longitud antero-posterior y dorso-ventral. En una primera instancia, se abordó el cálculo de la mortalidad mediante la aplicación de técnicas de dinámica de poblaciones basadas en el análisis de frecuencias de tallas; sin embargo estas técnicas no poseen una potencia de análisis suficiente como para permitir el cálculo de tasas mensuales de mortalidad y dentro del rango de tallas correspondiente a los berberechos analizados histopatológicamente. Se intentó también el cálculo de la mortalidad

mediante métodos de captura – recaptura, para ello se procedió al marcaje de berberechos con tinta indeleble y su disposición en cajas de malla plástica enterradas en el sustrato. La fuerte hidrodinámica de la zona hizo que la tasa de recuperación de los individuos marcados fuese muy baja y, tras varios meses con resultados infructuosos, se decidió rechazar esta metodología. Finalmente, con el fin de valorar en cierta medida la magnitud de la mortalidad de berberecho en *Misela*, se estimó el número de berberechos muertos recientemente, comprendidos en un rango de tallas análogo a los analizados histopatológicamente, que aparecían mensualmente por metro cuadrado en la zona de estudio. Esta variable se estimó a partir del número de berberechos recolectados mediante calicatas en cada fecha de muestreo y, basándose en las observaciones de Pérez-Camacho (1979) según las cuales el ligamento de *Tapes decussatus* conservaba su flexibilidad hasta 50 días después de la muerte, se consideraron como muertos recientemente aquellos berberechos vacíos cuyas valvas aparecían todavía unidas mediante un ligamento elástico.

En el banco de *Lombos do Ulla* no se estimó la mortalidad debido a que su carácter submareal imponía una metodología de estudio que superaba los medios disponibles en el proyecto.

Con los datos de “mortalidad” mensual estimados se evaluó la correlación de la misma con la prevalencia e intensidad media poblacional de afectación por neoplasia, así como con diferentes parámetros ambientales. Para ello se emplearon índices de correlación por rangos de Spearman, calculados mediante el programa informático de estadística MINITAB 14.0.

#### **V.3.1.4. Relación con la edad**

Normalmente los bancos marisqueros de berberecho gallegos basan su explotación en la clase de edad anual correspondiente al reclutamiento/s del año anterior. En *Misela* esto se confirma (Mejuto 1984a) y, con la excepción de berberechos residuales de 2-3 años de edad, a lo largo del año solamente existe una única clase de edad en el banco hasta el momento en que tiene lugar el reclutamiento de berberechos juveniles correspondiente al año en curso. Ambas clases conviven durante un tiempo y a continuación la clase adulta prácticamente desaparece debido a la explotación marisquera. Con el fin de estudiar la relación existente entre la neoplasia y la edad de los berberechos, se recolectaron en *Misela*, berberechos comerciales adultos ( $L > 28$  mm: 1-2 años de edad) y juveniles (rango talla: 10 - 21 mm; edad menor de un año) en

aquellos momentos a lo largo del período de estudio en los que se dio la coexistencia de ambas clases de edad (septiembre, octubre y noviembre de 1999, y agosto de 2000). Se realizaron cortes histológicos de estos individuos y, mediante su observación al microscopio óptico, se diagnosticó si sufrían la enfermedad. En base a dicho diagnóstico se calculó la prevalencia de neoplasia para cada grupo de edad y período de muestreo.

Para analizar la existencia de asociación entre la edad y la afectación por neoplasia se realizaron tests de Friedman en el que las variables analizadas fueron la prevalencia de neoplasia diseminada, los tratamientos fueron las clases de edad (juveniles y adultos) y los bloques los constituyeron los diferentes períodos de muestreo. Para la realización de los análisis se empleó la aplicación informática estadística MINITAB 14.0, eliminándose aquellos berberechos que presentaban intensidades importantes de otras alteraciones patológicas.

### **V.3.2. EFECTOS DE LA NEOPLASIA DISEMINADA EN LA CONDICIÓN**

Para evaluar el efecto de la neoplasia sobre la condición de *Cerastoderma edule*, se recolectaron en *Misela* 150 berberechos adultos ( $30,6 \pm 0,15$  mm) en junio de 2000 (momento de prevalencia de neoplasia alta y en el que la condición gonadal era elevada debido a que presentaban su gónada madura) y 122 berberechos adultos ( $29,6 \pm 0,27$  mm) en noviembre de 2000 (prevalencia elevada y condición gonadal baja debido a que los berberechos se encontraban en reposo gonadal). Se registró el peso vivo total y el peso húmedo sólo de los tejidos blandos de cada individuo. A continuación se extrajo una pieza de tejidos de unos 5 mm de espesor que fue procesada mediante las técnicas histológicas convencionales ya descritas, con el fin de diagnosticar la intensidad de neoplasia diseminada conforme a la escala descrita en el apartado IV.3.2.7. El resto de vianda de cada berberecho se pesó en fresco y después se sometió a un proceso de desecación en estufa ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h). Tras ello, se calculó para cada individuo la razón peso seco - peso húmedo, y dicho cociente se aplicó al peso húmedo total de la carne inicial para hallar su correspondencia en peso seco. La concha de cada individuo también se sometió a secado en las mismas condiciones que la carne ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 h) y se pesó a continuación. Se calcularon los dos índices de condición siguientes (Mann 1978; Lucas & Beninger 1985):



$$IC_{(i)} = \text{Peso seco carne} \times 100 / \text{Peso seco concha}$$

$$IC_{(ii)} = \text{Peso seco carne} \times 100 / (\text{Peso húmedo total} - \text{Peso seco concha})$$

Los índices de condición y los valores de peso seco de los individuos sanos y aquellos afectados por neoplasia diseminada fueron comparados mediante tests no paramétricos de Kruskal-Wallis, ya que no cumplían los requerimientos para la aplicación de un test paramétrico de análisis de la varianza. Los berberechos afectados por esporoquistes de trematodos fueron eliminados de la comparación para evitar interferencias en el estudio.

## **V.4. RESULTADOS**

### **V.4.1. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA NEOPLASIA DISEMINADA**

#### **V.4.1.1. Variación temporal**

Las prevalencias y la intensidad media poblacional de neoplasia diseminada en *Misela* y *Lombos do Ulla* registradas a lo largo del período estudiado se muestran en las Tablas V.1 y V.2 y en las Figuras V.1 y V.2. La neoplasia presentó niveles epizooticos en ambos bancos a lo largo de todo el año. La prevalencia media en *Misela*, correspondiente a 21 muestras mensuales, fue del 26 % con un rango de variación que osciló entre valores del 8 % y el 44 %. La prevalencia media en *Lombos do Ulla* fue del 25 %, pero con un rango de oscilación más amplio: 4 – 52 %, en 11 muestras mensuales de seguimiento. No se detectaron diferencias significativas en la prevalencia de neoplasia diseminada entre ambos bancos ( $S=0,09$ ;  $GL= 1$ ;  $P= 0,763$ ) a lo largo del período temporal coincidente.

En cuanto a los valores medios de intensidad media poblacional de neoplasia, éstos fueron de 0,5 para los dos bancos, con un rango de variación en el período de estudio de 0,1 – 0,9 en *Misela* y 0,1 – 1,2 en *Lombos do Ulla*. Tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad media poblacional de neoplasia entre ambos bancos ( $S=2,27$ ;  $GL=1$ ;  $P=0,132$ ).

En la Figura V.2 se representa la evolución mensual de la prevalencia en los bancos de *Misela* (Fig. V.2A) y de *Lombos do Ulla* (Fig. V.2B), detallando la distribución de los individuos neoplásicos dentro de cada categoría de intensidad de neoplasia. En la Figura V.1.B se muestra la dinámica de la intensidad media poblacional de neoplasia en ambas poblaciones. En ambos bancos existe una correlación positiva significativa entre prevalencia e intensidad media poblacional de neoplasia (*Misela*:  $r_s=0,624$ ,  $P=0,003$ ; *Lombos do Ulla*:  $r_s=0,955$ ,  $P=0,000$ ).

Se observaron dos períodos de mayor prevalencia de neoplasia: uno a final de primavera principio de verano (mayo-junio) y otro en otoño tardío principio de invierno (octubre-diciembre), mientras que durante el invierno y final de verano-principio de otoño se registraron valores mínimos.

A lo largo del período estudiado, el primer máximo de prevalencia de neoplasia en *Misela* (Fig. V.1A y V.2A) se dio en junio de 1999, a continuación los valores de afectación disminuyeron entre julio y septiembre, comenzando de nuevo a aumentar hasta valores máximos entre los meses de octubre y diciembre del mismo año. De nuevo disminuyó la afectación por neoplasia a lo largo del invierno y aumentó en primavera-verano, aunque con valores inferiores a los registrados en la misma época el año anterior. En noviembre de 2000 una vez más la neoplasia alcanza valores máximos de prevalencia en *Misela*.

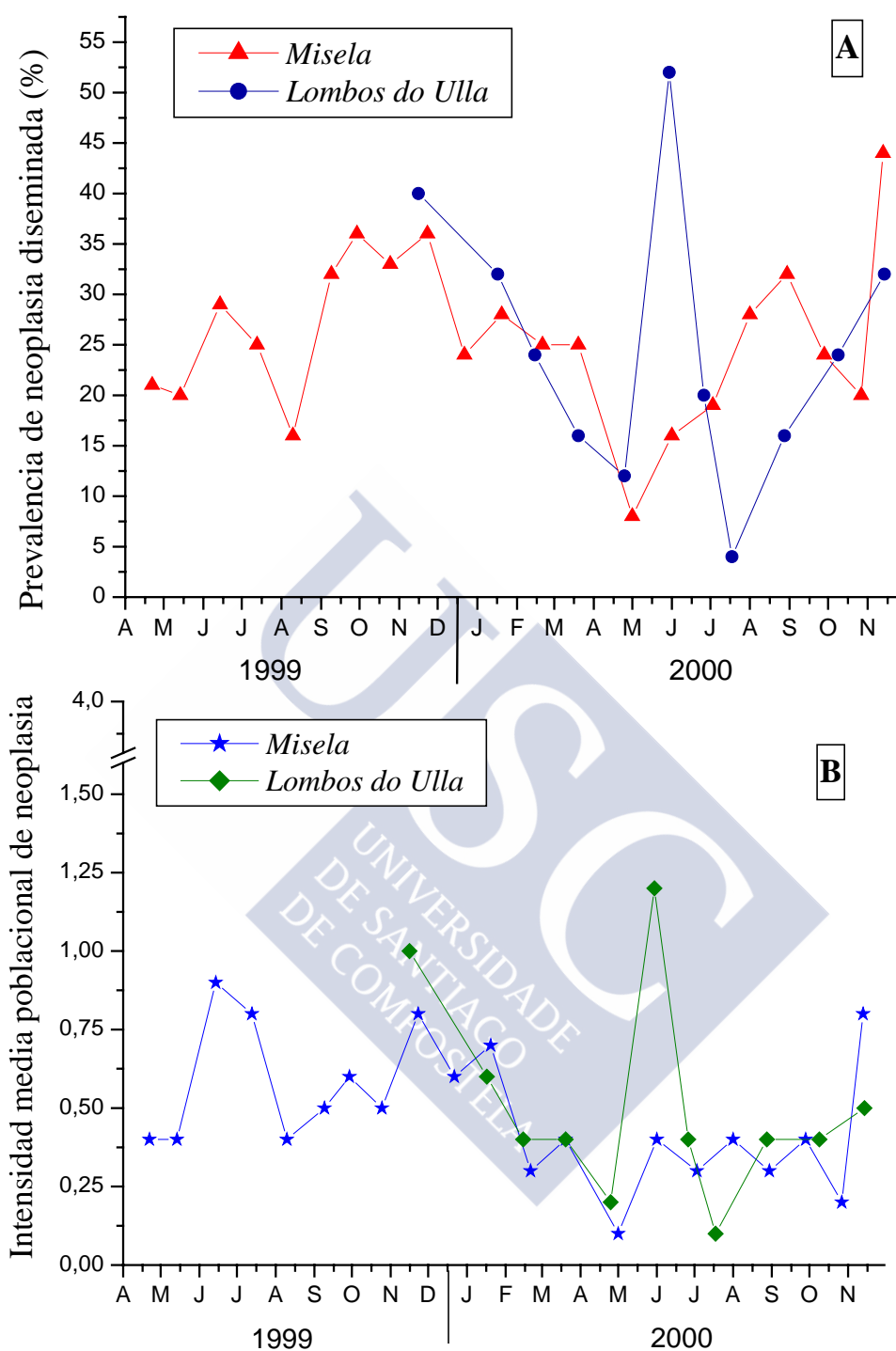
La dinámica de la neoplasia en la población de *Lombos do Ulla* (Fig. V.1A y V.2B) presentó un patrón general similar al observado en *Misela*. Así, se detectó un máximo de afectación en noviembre de 1999, la prevalencia disminuyó de manera continua hasta alcanzar valores mínimos al final del invierno principio de la primavera (febrero-abril) y, a finales de mayo de 2000, se registró un máximo de prevalencia de neoplasia. Ésta disminuyó de manera marcada en los meses de junio y julio, para de nuevo aumentar de manera continua hasta alcanzar un nuevo máximo en noviembre de 2000.

**Tabla V.1:** Prevalencia de neoplasia diseminada en berberechos de *Misela* (Ría de Noia) en diferentes meses de los años 1999 y 2000

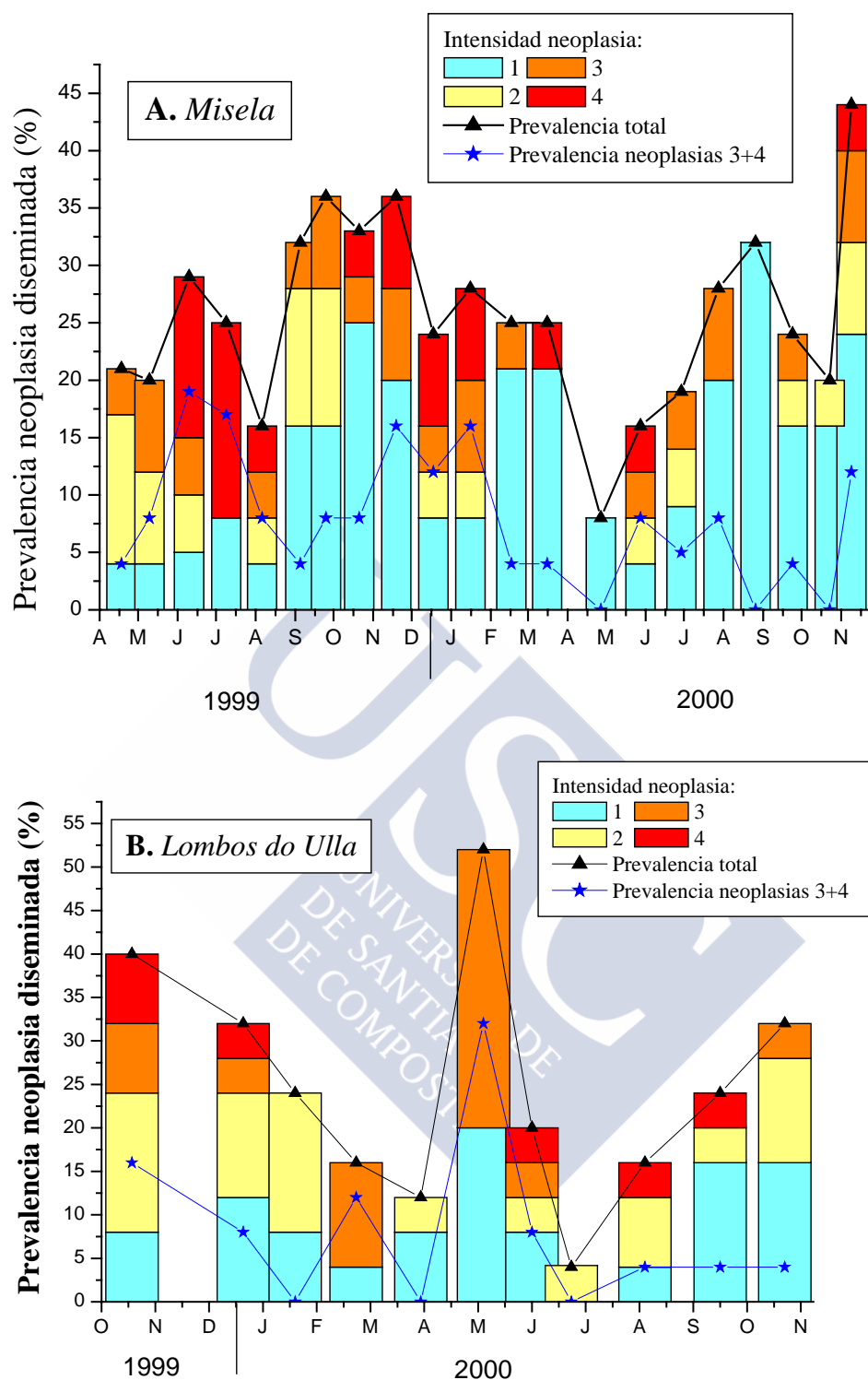
Fecha de muestreo	Nº berberechos analizados	Porcentaje de neoplásicos	Porcentaje en cada nivel de severidad de neoplasia				Intensidad media poblacional
			1	2	3	4	
1999							
22 abril	25	21	4	13	4	0	0,4
14 mayo	25	20	4	8	8	0	0,4
14 junio	22	29	5	5	5	14	0,9
13 julio	24	25	8	0	0	17	0,8
10 agosto	25	16	4	4	4	4	0,4
9 septiembre	25	32	16	12	4	0	0,5
29 septiembre	25	36	16	12	8	0	0,6
25 octubre	25	33	25	0	4	4	0,5
23 noviembre	25	36	20	0	8	8	0,8
22 diciembre	25	24	8	4	4	8	0,6
2000							
20 enero	25	28	8	4	8	8	0,7
21 febrero	25	25	21	0	4	0	0,3
20 marzo	25	25	21	0	0	4	0,3
3 mayo	25	8	8	0	0	0	0,1
1 junio	25	16	4	4	4	4	0,4
3 julio	25	19	9	5	5	0	0,3
1 agosto	25	28	20	0	8	0	0,4
30 agosto	25	32	32	0	0	0	0,3
28 septiembre	25	24	16	4	4	0	0,4
27 octubre	25	20	16	4	0	0	0,2
13 noviembre	25	44	24	8	8	4	0,8
GLOBAL	521	26	14	4	4	4	0,5

**Tabla V.2 :** Prevalencia de neoplasia diseminada en berberechos de *Lombos do Ulla* (Ría de Arousa) en diferentes meses de los años 1999 y 2000

Fecha de muestreo	Nº berberechos analizados	Porcentaje de neoplásicos	Porcentaje en cada nivel de severidad de neoplasia				Intensidad media poblacional
			1	2	3	4	
1999							
16 noviembre	25	40	8	16	8	8	1,0
2000							
17 enero	25	32	12	12	4	4	0,6
15 febrero	25	24	8	16	0	0	0,4
20 marzo	25	16	4	0	12	0	0,4
25 abril	25	12	8	4	0	0	0,2
30 mayo	25	52	20	0	32	0	1,2
26 junio	25	20	8	4	4	4	0,4
18 julio	24	4	0	4	0	0	0,1
28 agosto	25	16	4	8	0	4	0,4
9 octubre	25	24	16	4	0	4	0,4
14 noviembre	25	32	16	12	4	0	0,5
GLOBAL	274	25	9	7	6	2	0,5



**Figura V.1:** Evolución de la prevalencia (A) y de la intensidad media poblacional (B) de neoplasia diseminada en *Misela* y *Lombos do Ulla* a lo largo del período estudiado.



**Figura V.2:** Dinámica de la prevalencia de neoplasia diseminada en las poblaciones de berberecho de *Misela* (A) y *Lombos do Ulla* (B) con referencia a los diferentes niveles de intensidad de la misma en cada uno de los períodos muestreados. Se muestra la evolución de la prevalencia de neoplasia severa (intensidad 3 y 4).

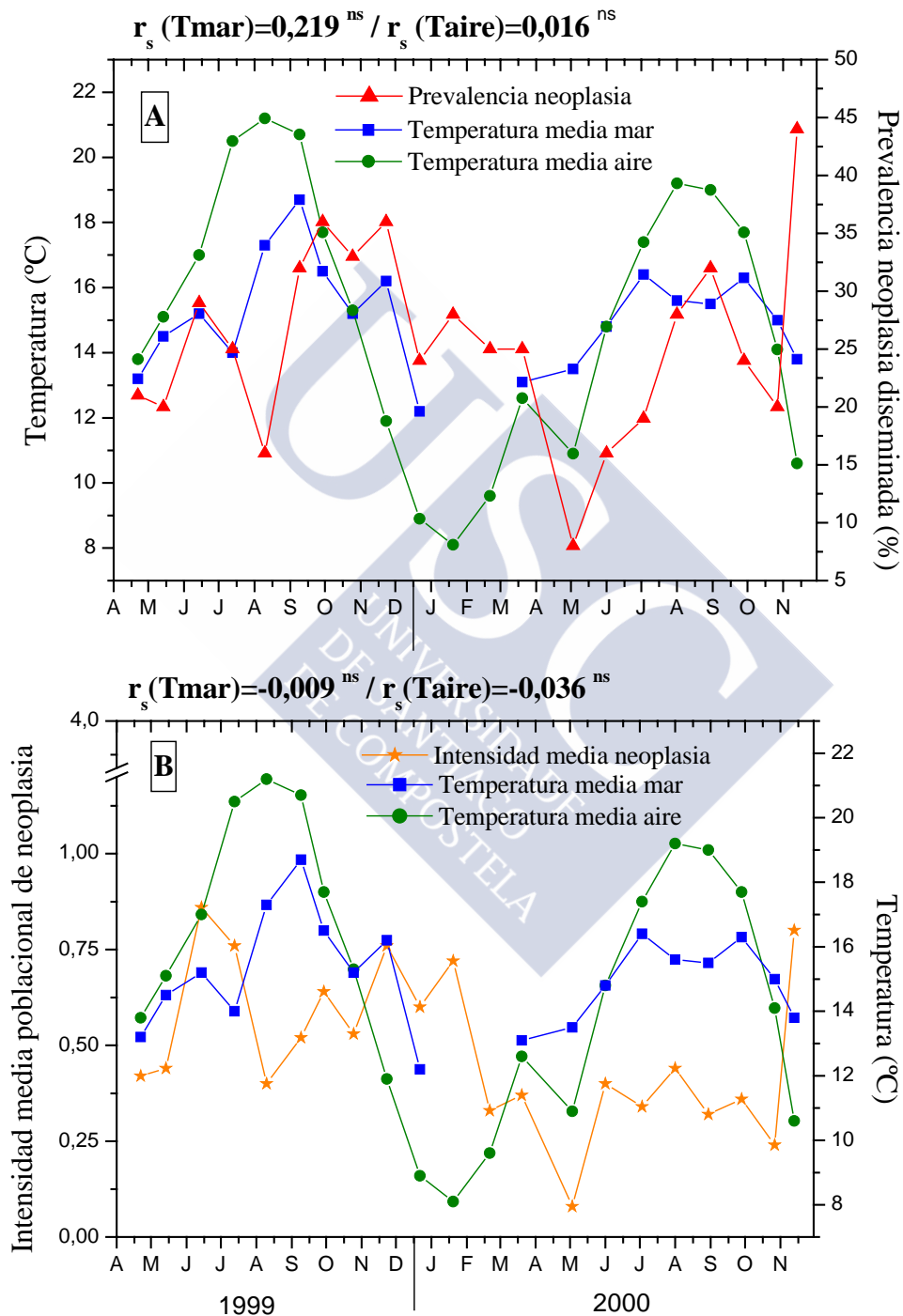


#### V.4.1.2. Correlación con variables ambientales

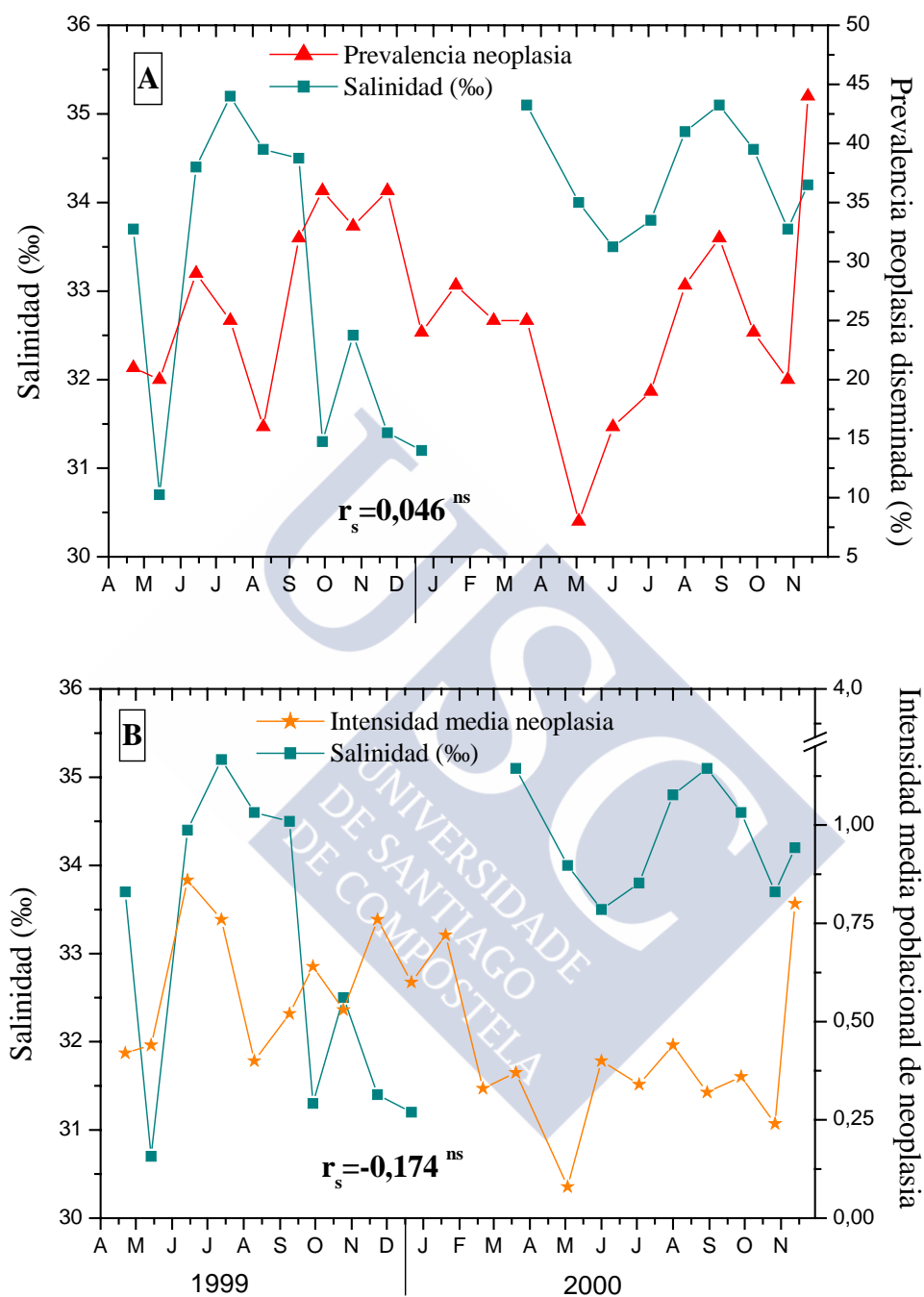
En las Figuras V.3 a V.5 se representa la variación mensual de prevalencia (A) y de intensidad media poblacional (B) de neoplasia en *Misela* frente a diferentes variables ambientales (temperatura del mar y del aire, salinidad y concentración de clorofila *a*) registradas en la zona. La temperatura atmosférica y del agua de mar mostraron un patrón de variación similar, con valores totalmente dentro de los márgenes previsibles de un clima atlántico como es el gallego, aunque con un rango mayor de variación en el caso de la temperatura atmosférica (temperatura media mensual mínima: 8,1 °C en el mes de enero de 2000; temperatura media mensual máxima: 21,2 °C en agosto de 1999). La salinidad mantuvo valores bastante estables a lo largo de todo el período de estudio y en un rango propio de zonas euhalinas (30,7 – 35,2 ‰). Los valores de concentración de clorofila *a* oscilaron entre valores mínimos de 0,2 y máximos de 4,5 µg/L. Se calcularon coeficientes de correlación por rangos de Spearman entre dichas variables y los valores mensuales de prevalencia e intensidad media de neoplasia, y no se observó la existencia de correlación alguna estadísticamente significativa.

Las Figuras V.6 a V.9 representan lo mismo pero para la población de berberecho de *Lombos do Ulla*. La temperatura atmosférica y del agua de mar mostraron un patrón de variación similar, con valores también dentro de la normalidad, (temperatura media mensual del aire mínima: 9,4 °C en el mes de enero de 2000; temperatura media mensual máxima: 20,2 °C en agosto de 2000). Como ya se comentó, las salinidades extremadamente bajas que se registraron en diciembre de 2000 debido a lluvias torrenciales causaron una mortalidad masiva de moluscos que obligó a interrumpir el seguimiento. Sin embargo previamente, a lo largo de todo el período de estudio, la salinidad mantuvo valores bastante estables (rango 32,0 – 34,5 ‰) con la excepción del mes de mayo de 2000 en que tuvo lugar una bajada de la salinidad a valores de 29,3 ‰, como consecuencia de las elevadas precipitaciones que tuvieron lugar en abril de 2000 (Figura V.8C). Los valores de concentración de clorofila *a* oscilaron entre valores mínimos de 0,4 y máximos de 6,8 µg/L. No se detectó correlación entre la evolución temporal de la neoplasia, la temperatura y la concentración de clorofila *a* (Figuras V.6 y 7). En el caso de esta población sí parece existir una correlación negativa estadísticamente significativa ( $r_s = -0,726$ ,  $P = 0,041$ ) entre la salinidad y la prevalencia de neoplasia (Fig. IV.B.8A). No se detectó, sin embargo, dicha correlación entre la intensidad media poblacional de neoplasia y la

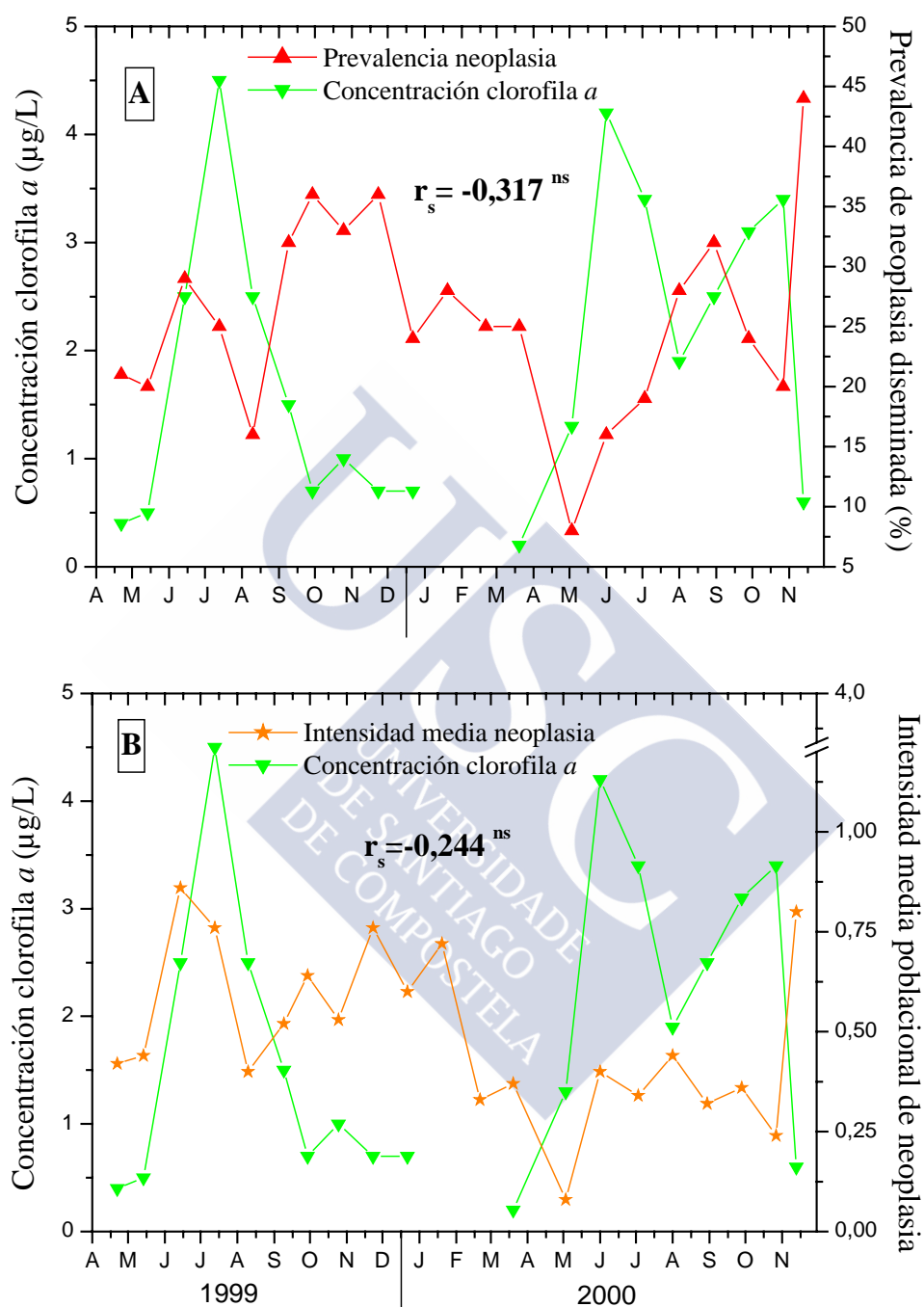
salinidad ( $p>0,05$ ; Fig. V.8B), lo que parece indicar que la correlación depende de la categoría de intensidad de afectación. En la Figura V.9 se confirma que la correlación negativa entre prevalencia de neoplasia y salinidad existe entre los individuos afectados por neoplasias ligeras y moderadas ( $r_s = -0,745$ ;  $P=0,034$ ), pero no en los afectados por neoplasias intensas ( $P>0,05$ ).



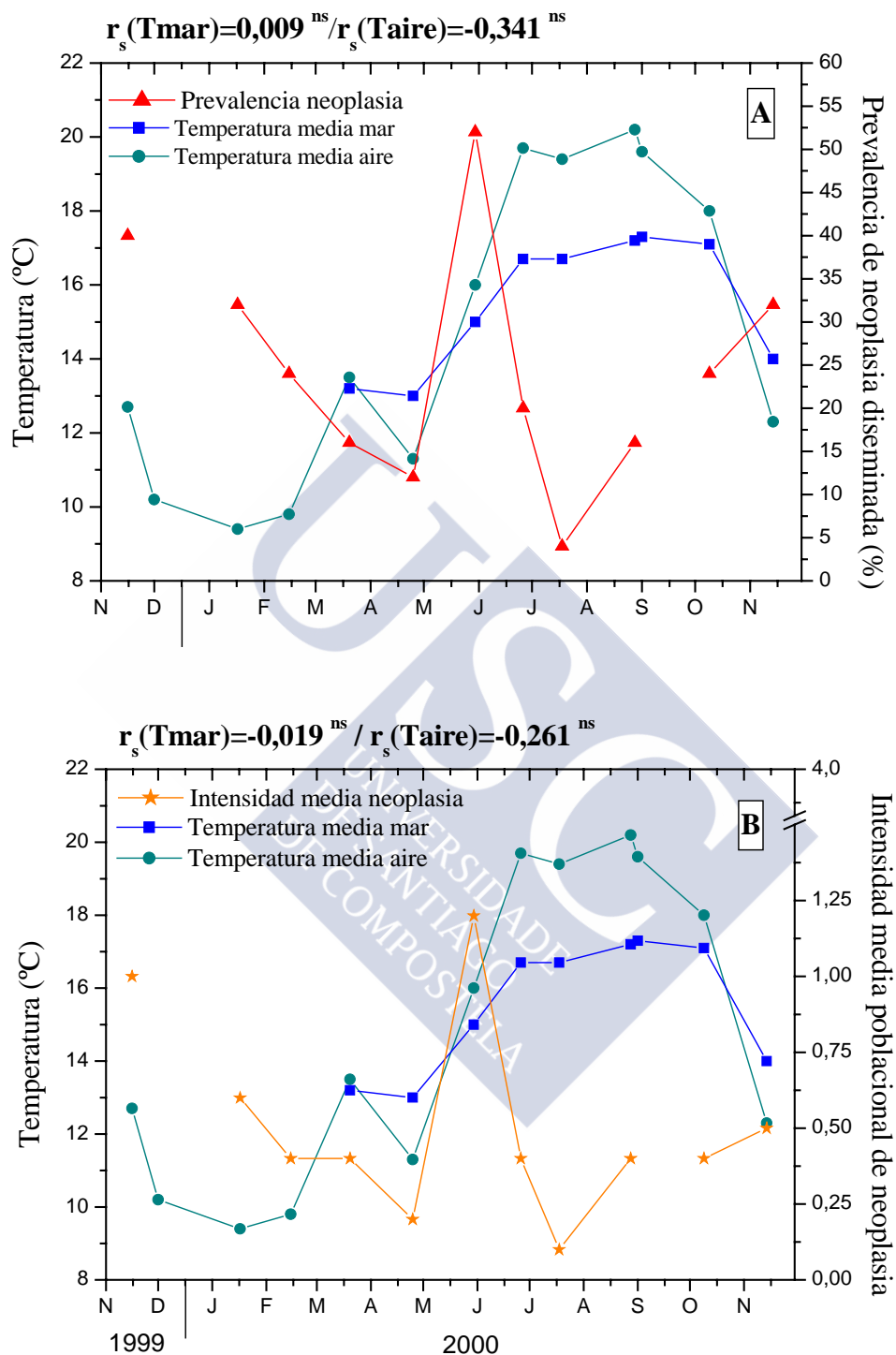
**Figura V.3:** Variación mensual de la prevalencia (A) y de la intensidad media poblacional (B) de neoplasia diseminada en berberechos de *Misela* y de la temperatura media mensual del mar y del aire en el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



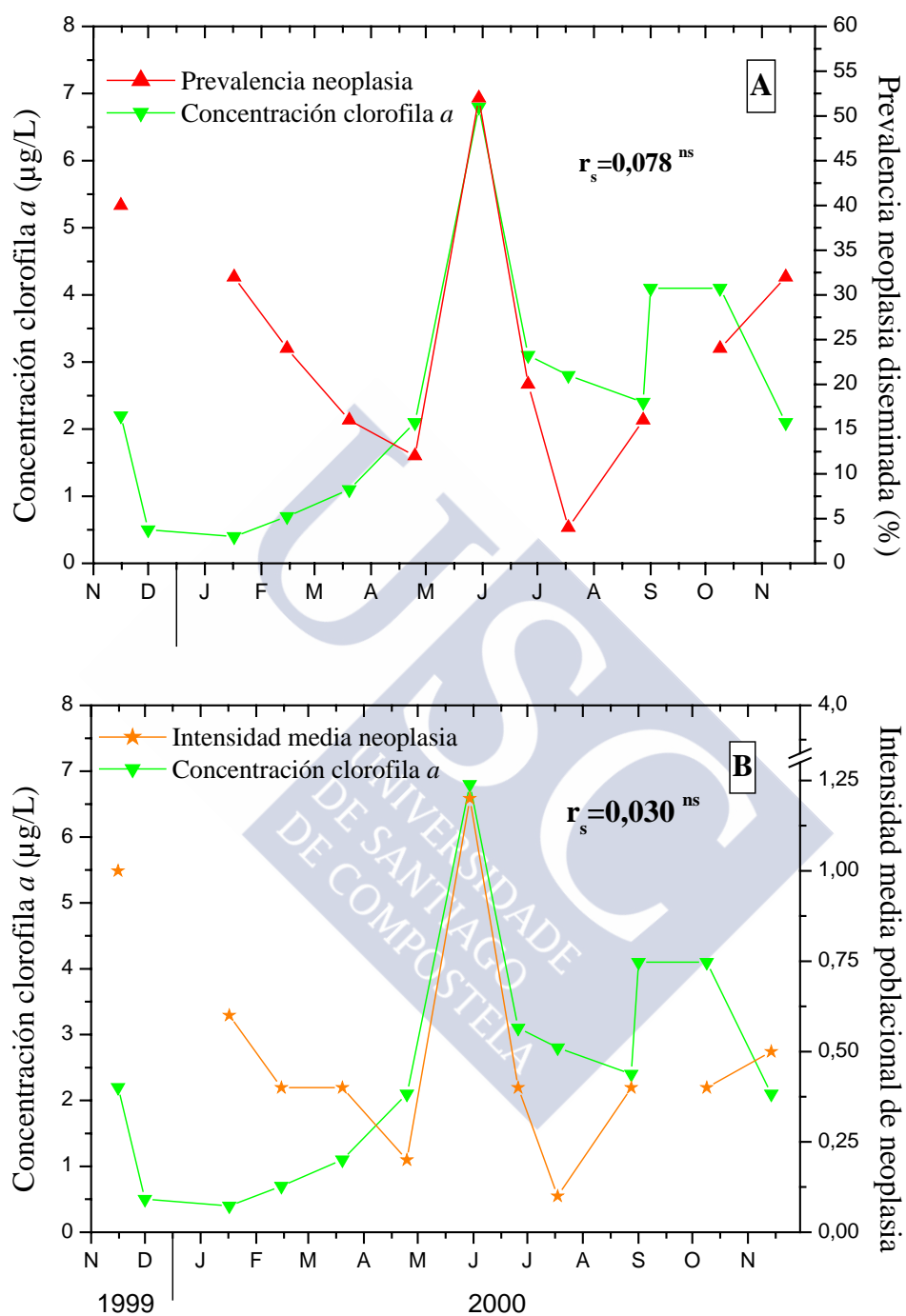
**Figura V.4:** Distribución mensual de la prevalencia (A) y de la intensidad media poblacional (B) de neoplasia diseminada en berberechos de *Misela* y de la salinidad media mensual del mar en el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



**Figura V.5:** Distribución mensual de la prevalencia (A) y de la intensidad media poblacional (B) de neoplasia diseminada en berberechos de *Misela* y de la concentración de clorofila *a* correspondiente el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.

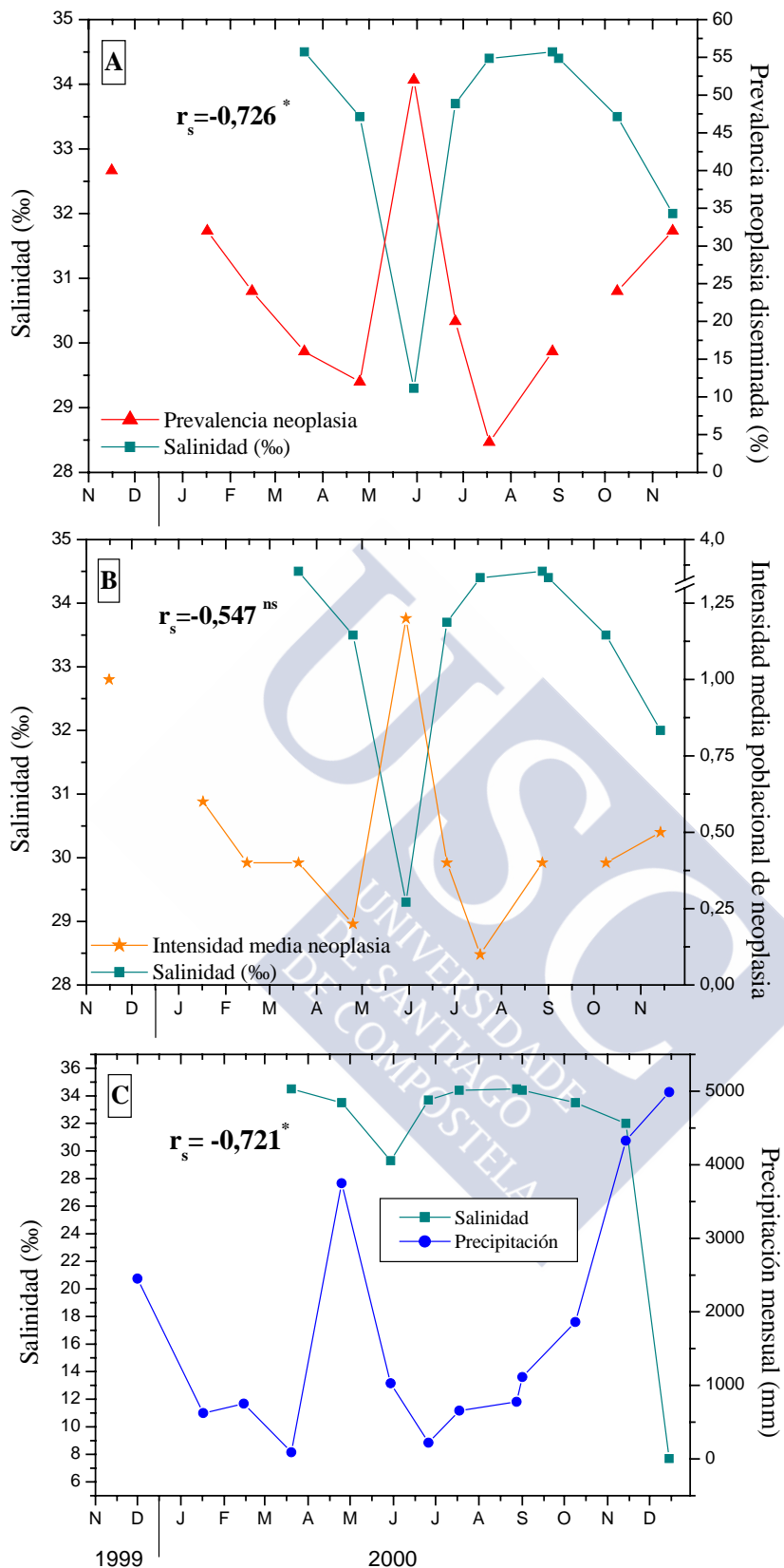


**Figura V.6:** Variación mensual de la prevalencia (A) y de la intensidad media poblacional (B) de neoplasia diseminada en berberechos de *Lombos do Ulla* y de la temperatura media mensual del mar y del aire en el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.

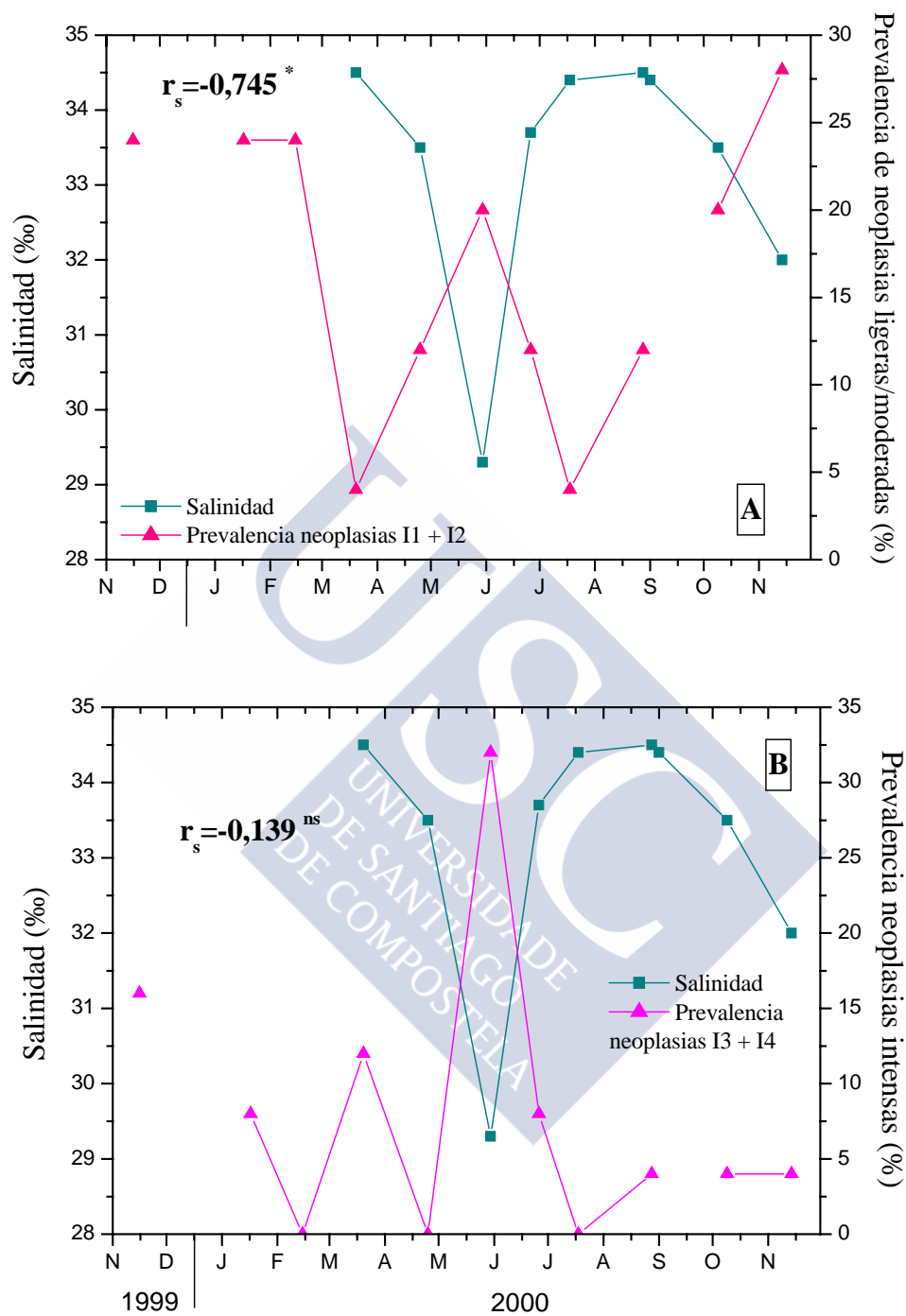


**Figura V.7:** Distribución mensual de la prevalencia (A) y de la intensidad media poblacional (B) de neoplasia diseminada en berberechos de *Lombos do Ulla* y de la concentración de clorofila *a* correspondiente el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.





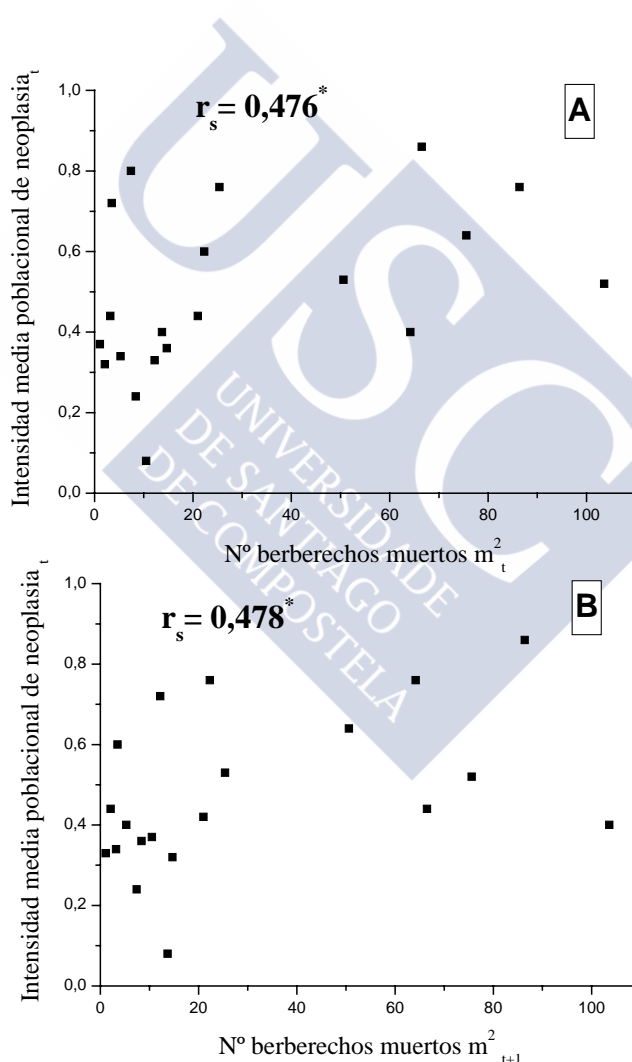
**Figura V.8:** Distribución mensual de la prevalencia (A) y de la intensidad media poblacional (B) de neoplasia diseminada en berberechos de *Lombos do Ulla* y de la salinidad media del mar en el período estudiado. (C) Correlación existente entre la precipitación y la salinidad. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman entre las variables representadas.



**Figura V.9:** Distribución mensual de la prevalencia de neoplasias ligeras y moderadas (A) y de neoplasias intensas (B) y de la salinidad del agua de mar correspondientes a *Lombos do Ulla* entre noviembre de 1999 y noviembre de 2000. Los valores de  $r_s$  corresponden a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman entre las variables representadas.

### V.4.1.3. Mortalidad

Se ha comprobado la existencia de una correlación significativa entre la intensidad media poblacional de neoplasia diseminada y el número de individuos muertos por metro cuadrado contabilizados en el muestreo del mismo mes ( $r_s = 0,476$ ;  $P = 0,034$ ; Fig. V.10.A) y del mes siguiente ( $r_s = 0,478$ ;  $P = 0,033$ ; Fig. V.10.B). No existe correlación significativa entre estas mismas variables cuando se intenta su cálculo con un desfase de dos meses ( $P > 0,05$ ). No se verificó correlación significativa alguna entre el número de individuos muertos por metro cuadrado y la prevalencia mensual de neoplasia. Asimismo tampoco se observó correlación con ninguna de las variables ambientales estudiadas.



**Figura V.10:** **A.** Correlación existente entre la intensidad media poblacional de neoplasia diseminada en el momento t y la mortalidad registrada en ese mismo muestreo (t). **B.** Correlación existente entre la intensidad media poblacional de neoplasia diseminada en el momento t y la mortalidad registrada en el siguiente muestreo (t+1).  $r_s$ = Coeficiente de correlación mediante rangos de Spearman.

#### V.4.1.4. Relación con la edad

La Tabla IV.B.3 muestra los valores de prevalencia de neoplasia diseminada de berberechos juveniles y adultos determinada en los diferentes muestreos realizados en *Misela*. Los resultados del test de Friedman realizado confirman la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $S=6,00$ ;  $GL=1$ ;  $P=0,014$ ) en la prevalencia de neoplasia diseminada entre ambos grupos de edad a lo largo del período de estudio, siendo claramente mayor la prevalencia entre los berberechos de la clase adulta comercial. El berberecho más pequeño detectado afectado por neoplasia diseminada en el presente estudio, presentaba una talla de 10 mm de longitud anteroposterior.

**Tabla V.3:** Prevalencia de neoplasia diseminada detectada en berberechos de *Misela* pertenecientes a diferentes clase de edad

Fecha de muestreo	Prevalencia de neoplasia (%)	
	Juveniles	Adultos
9/09/1999	0	36
29/09/1999	8	38
25/10/1999	4	28
23/11/1999	29	36
1/08/2000	0	29
30/08/2000	11	18
Valor medio	9	31

#### V.4.2. EFECTOS DE LA NEOPLASIA DISEMINADA EN LA CONDICIÓN

En la Tabla V.4 se muestran los valores medios de dos índices de condición y de peso seco de vianda, correspondientes a berberechos recolectados en *Misela* en dos períodos diferentes del año y que fueron clasificados conforme a la intensidad de afectación por neoplasia diseminada. No se encontraron diferencias significativas en la condición y en la biomasa de la vianda entre categorías de intensidad ( $P>0,05$ ). El resultado fue el mismo agrupando categorías de afectación y períodos de estudio. Se

observó, sin embargo en los dos períodos estudiados, una tendencia de disminución del valor de los diferentes índices de condición calculados (con la excepción del IC<sub>(ii)</sub> en el mes de noviembre) y del peso seco de la vianda en los berberechos que presentaban una mayor intensidad de neoplasia (4) con respecto al resto de categorías. Esta diferencia, sin embargo, no resultó significativa a nivel estadístico.

**Tabla V.4:** Valores medios ( $\pm$  error estándar) de dos índices de condición diferentes y de peso seco de la vianda en berberechos de *Misela* correspondientes a diferentes categorías de intensidad de neoplasia diseminada

Junio	Categorías de intensidad de afectación	Número de individuos examinado	IC <sub>(i)</sub>	IC <sub>(ii)</sub>	Peso seco (g)
	0	103	7,80 $\pm$ 0,11	6,03 $\pm$ 0,09	0,31 $\pm$ 0,01
	1	22	8,20 $\pm$ 0,85	6,44 $\pm$ 0,65	0,32 $\pm$ 0,02
	2	8	8,61 $\pm$ 0,79	6,67 $\pm$ 0,83	0,36 $\pm$ 0,05
	3	6	8,20 $\pm$ 0,33	6,13 $\pm$ 0,25	0,31 $\pm$ 0,02
	4	6	<b>7,44 <math>\pm</math> 0,59</b>	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,31</b>	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,03</b>
	Global neoplásicos	42	8,17 $\pm$ 0,48	6,34 $\pm$ 0,38	0,32 $\pm$ 0,02
Noviembre	Categorías de intensidad de afectación	Número de individuos examinado	IC <sub>(i)</sub>	IC <sub>(ii)</sub>	Peso seco (g)
	0	88	7,81 $\pm$ 0,30	7,27 $\pm$ 0,32	0,37 $\pm$ 0,04
	1	17	6,70 $\pm$ 0,42	8,21 $\pm$ 1,74	0,32 $\pm$ 0,03
	2	5	7,71 $\pm$ 0,52	6,76 $\pm$ 0,43	0,35 $\pm$ 0,04
	3	7	7,27 $\pm$ 0,20	6,48 $\pm$ 0,46	0,29 $\pm$ 0,03
	4	5	<b>6,19 <math>\pm</math> 0,63</b>	7,65 $\pm$ 1,50	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,03</b>
	Global neoplásicos	34	6,89 $\pm$ 0,25	7,55 $\pm$ 0,90	0,31 $\pm$ 0,02

\*En negrita los valores medios de IC y peso seco de berberechos afectados por neoplasia diseminada en su mayor grado de intensidad de afectación y con valores netamente inferiores a los de berberechos sanos.

## V.5. DISCUSIÓN

Durante el período de estudio la neoplasia diseminada presentó niveles epizooticos en ambos bancos a lo largo de todo el año. Se observó en ambas poblaciones, un patrón general común en cuanto al porcentaje de individuos enfermos y a la intensidad media poblacional de neoplasia. Dicho patrón parece seguir cierta tendencia estacional de carácter cíclico y bimodal, de manera que existirían dos máximos anuales de afectación: uno a final de primavera - principio de verano, y otro en otoño tardío - principio de invierno; durante el invierno y al final del verano - principio de otoño los valores de neoplasia serían mínimos. Este patrón se asemeja al descrito por Twomey & Mulcahy (1988a) en berberechos del sur de Irlanda, si bien los valores de prevalencia en el caso irlandés (con una prevalencia media del 39 % y valores máximos del 72 %) fueron más elevados que los registrados en el presente estudio. Un patrón diferente, caracterizado por presentar mayores prevalencias en el período comprendido entre el final del otoño y la primavera, y descensos en la prevalencia durante el verano, ha sido descrito en varias especies susceptibles de presentar niveles elevados de afectación por neoplasia (Elston *et al.* 1992, Collins 1998, Barber 2004). Así, Christensen *et al.* (1974) citan un patrón bifásico en una neoplasia del epitelio branquial presente en *Macoma balthica* de Chesapeake Bay, en el que los picos de incidencia se registraron en mayo-julio y en septiembre-octubre. Cooper *et al.* (1982b) describen también un patrón bimodal de afectación en una población de *Mya arenaria* de Allen Harbour en Rhode Island, de manera que existían individuos afectados por neoplasia hemocitaria durante todo el año pero con picos de prevalencia en otoño y al final de la primavera. Mix (1983) describe un incremento en la prevalencia de una neoplasia hemocitaria de *Mytilus edulis* de Oregon en el período final de otoño-invierno. Este patrón fue consistente durante 5 años de seguimiento, destacando además que la enfermedad no desapareció de la población en ningún momento del año. Cosson-Mannevy *et al.* (1984) estudian la prevalencia de una neoplasia hemocitaria en diferentes poblaciones de *M. edulis* del sur de la Isla de Vancouver, encontrando que existían diferencias en los picos de prevalencia entre los distintos lugares, de manera que el máximo se dio en junio en una de las poblaciones y en diciembre en otras dos. Farley *et al.* (1986) citan altas prevalencias de sarcomas afectando a *Mya arenaria* de Chesapeake Bay entre diciembre y abril.



La componente estacional, citada en las numerosas referencias bibliográficas al respecto, sugiere que los factores ambientales juegan un papel importante en la dinámica de esta enfermedad (Barber 1990). La variación ambiental a nivel microgeográfico es común en ciertos ambientes marinos como el ecosistema intermareal, y en muchos casos puede ser más importante que la estación climatológica en la definición de factores de estrés (Elston *et al.* 1992). En algunas de las referencias bibliográficas anteriormente citadas se sugieren diferentes factores que podrían contribuir a explicar los patrones descritos.

Cooper *et al.* (1982b) asocian las bajas temperaturas del agua con el incremento en la severidad de la neoplasia y con un mayor porcentaje de estados de intensidad elevada. Las elevadas temperaturas causarían la súbita disminución de estos estados de máxima afectación. La temperatura podría ejercer un efecto sobre la disponibilidad y/o actividad de un agente etiológico (como podría ser un virus), así como sobre la capacidad de defensa del hospedador (Twomey & Mulcahy 1988a; Barber 1990). El berberecho parece ser, además, una especie muy susceptible a temperaturas extremas asociadas con inviernos muy fríos y veranos muy tórridos (Hancock & Urquhart 1965; Seed & Brown 1975). En el presente estudio no se observó asociación alguna entre la afectación por neoplasia y las temperaturas (atmosféricas y del agua) registradas en el medio, si bien el rango de temperaturas existente durante el período estudiado fue normal y no alcanzó en ningún momento valores que se puedan considerar extremos para esta especie.

La salinidad es otra variable ambiental que han incluido ciertos autores para explicar el patrón de máximos de prevalencia detectado en los meses invernales (Mix 1983; Barber 1990). Ésta no parece estar relacionada con la aparición de desórdenes neoplásicos siempre que no varíe significativamente. Sin embargo, períodos de salinidad reducida tras episodios de precipitaciones intensas pueden constituir un factor adicional de estrés y ejercer un papel indirecto en el incremento de la prevalencia (Mix 1983). Este hecho se comprobó en el caso de los berberechos de *Lombos do Ulla*, donde existió una correlación clara entre el descenso de la salinidad, debido a fuertes precipitaciones, y el incremento de la prevalencia de neoplasia por la aparición de nuevos casos de neoplasia diseminada. En el caso de *Misela* se detectó un ligero incremento de la prevalencia coincidiendo con un mínimo de salinidad; sin embargo no llegó a apreciarse un efecto significativo en el patrón general de evolución de la neoplasia. Aunque el nivel de precipitación fue similar en ambos bancos, éste no se

tradujo en un descenso tan manifiesto de la salinidad en *Misela*. Probablemente los embalses de los ríos de cabecera y su régimen de apertura de compuertas jueguen un papel fundamental en los descensos de la salinidad, y de ahí la diferencia encontrada entre *Lombos do Ulla* y *Misela* aún bajo un régimen de precipitaciones de igual magnitud.

El patrón de variación de concentración de clorofila *a* en los bancos estudiados no parece haber tenido influencia alguna sobre la dinámica de la enfermedad. Landsberg (1996) establece una relación circunstancial espacial y temporal entre la incidencia de neoplasia diseminada en ciertas especies de bivalvos y la detección de episodios de toxicidad por presencia de determinadas especies de dinoflagelados en el fitoplancton. A lo largo del presente estudio no se dispuso de la relación taxonómica de especies directamente implicadas en los diferentes pulsos de concentración de clorofila *a* y por tanto no se abordó la cuestión establecida por dicho autor. La concentración de clorofila *a* se considera un parámetro de referencia adecuado para valorar la disponibilidad de alimento existente en el medio, y se emplea habitualmente con el fin de establecer correlaciones con el estado nutricional del bivalvo. El estado fisiológico del organismo condiciona la susceptibilidad de éste a la enfermedad (Cheng 1993); sin embargo dicho estado fisiológico no depende exclusivamente del alimento disponible en el medio, sino también del nivel de demanda energética que exista en ese momento en el hospedador. Los fenómenos reproductivos asociados a la síntesis de gametos y a la puesta están reconocidos como importantes factores de estrés en moluscos bivalvos puesto que implican un gasto de energía muy grande (Cooper *et al.* 1982b; Balouet *et al.* 1986; Twomey & Mulcahy 1988a; Elston *et al.* 1992; Ford *et al.* 1997). Aunque este aspecto se desarrollará de forma más amplia en el capítulo IX, procede comentar en la presente discusión que en *Misela* se ha comprobado la existencia de un aumento importante en la prevalencia de neoplasia diseminada de forma coincidente con el período de puesta. Esta observación parece confirmar que la liberación de los gametos constituye un factor de estrés que contribuye a que los berberechos desarrollen la enfermedad (Cooper *et al.* 1982b; Balouet *et al.* 1986; Twomey & Mulcahy 1988a).

Cooper *et al.* (1982b) establecen que la neoplasia diseminada en *Mya arenaria* puede evolucionar de tres maneras diferentes: 1) adquirido cierto nivel elevado de intensidad de afectación, la neoplasia progresa de manera constante y origina la muerte del individuo; 2) puede adquirir un nivel estable de desarrollo y convertirse en una enfermedad crónica; y 3) a bajos niveles de afectación, el organismo puede desarrollar

con éxito mecanismos de defensa y conseguir la remisión de la enfermedad. Las variaciones de la prevalencia de neoplasia, en los patrones estacionales observados por diferentes autores, pueden ser explicadas por la combinación de factores como la adquisición de la enfermedad por nuevos individuos, la remisión en ciertos animales y, fundamentalmente, por la muerte de los organismos afectados (Cooper *et al.* 1982b; Twomey & Mulcahy, 1988a; Barber 1990; Elston *et al.* 1992). La correlación entre las variables ambientales y la dinámica temporal de la prevalencia de la enfermedad vendrá dada por la influencia de dichas variables en las tres posibles vías de evolución de la enfermedad. Aunque se ha observado cierta capacidad defensiva del hospedador contra la proliferación de células neoplásicas (Elston *et al.* 1988a; y en el presente estudio en el capítulo IV) y ciertos ejemplares logran vencer la enfermedad y muestran remisión de la enfermedad (Cooper *et al.* 1982b; Elston *et al.* 1988a), se ha confirmado experimentalmente el avance progresivo y desarrollo fatal de la neoplasia en diferentes especies de bivalvos, de manera que conduce a la muerte del organismo en un período de tiempo que oscila entre 3 y 6 meses (Cooper *et al.* 1982b; Farley *et al.* 1986; Elston *et al.* 1988a). Partiendo del bajo porcentaje con que ha sido observado el fenómeno de reacción defensiva contra las células neoplásicas en los berberechos gallegos (apenas media docena de casos en los más de 4000 berberechos analizados en la presente tesis) es de esperar que la remisión de la neoplasia a nivel poblacional tenga lugar en una proporción mínima. Por otra parte, según se desprende del análisis de los cortes histológicos, la neoplasia una vez alcanza niveles elevados de intensidad, causa daños estructurales muy graves en los tejidos y órganos de los berberechos. En base a todo esto, y a referencias de estudios de seguimiento de la incidencia de neoplasia en bivalvos (Cooper *et al.* 1982b; Twomey & Mulcahy 1988a, b; Elston *et al.* 1988a; Barber 1990), es de prever unas tasas de mortalidad importantes directamente relacionadas en principio con la prevalencia de los estados de intensidad de afectación más elevados. Debido a que resultó imposible evaluar la mortalidad de una manera adecuada, dicha relación no pudo ser contrastada. La determinación de relaciones causa-efecto entre signos de enfermedad y mortalidad en poblaciones naturales es muy complicada por diferentes factores (Elston *et al.* 1992): las poblaciones de moluscos bivalvos están sometidas a una mortalidad continua debido a un amplio espectro de causas de naturaleza genética, medioambiental, además de enfermedades infecciosas; las causas de la muerte son difíciles de determinar mediante técnicas histológicas o similares; los bivalvos moribundos se deterioran muy rápido en el ambiente marino. Sin

embargo, el hecho de la existencia de cierta correlación significativa entre la intensidad media de neoplasia y el número de berberechos que aparecían muertos sobre el sustrato por metro cuadrado parecen indicar que la neoplasia puede ser responsable de cierta mortalidad apreciable a nivel poblacional. Recientemente, además, se ha comprobado en varias poblaciones de berberecho de Galicia, entre las que se incluía *Misela*, la presencia de prevalencias más elevadas de neoplasia diseminada (así como intensidades mayores) en berberechos desenterrados que en berberechos normalmente enterrados (Díaz 2005). Este proceso de desenterramiento de los berberechos ha sido relacionado con la presencia de otros parásitos como trematodos (Lauckner 1983; Jonsson & André 1992; Bowers *et al.* 1996; Desclaux 2002, 2004) y se considera previo a la muerte del organismo. Factores fisiológicos como la falta de circulación de la hemolinfa debida a la obliteración de los senos y vasos del sistema circulatorio que puede ocasionar el acúmulo de células neoplásicas, así como la demanda mayor de oxígeno implicada en la proliferación mediante mitosis de las células neoplásicas (Sunila 1991) podrían ser responsables de dicho desenterramiento “voluntario” del bivalvo. La cuantificación de la mortalidad en las poblaciones naturales de berberecho de una manera apropiada y el establecimiento de correlaciones con la incidencia de la neoplasia es una tarea importante que debería ser abordada en un futuro con el fin de valorar la significación que dicha patología puede tener en la producción marisquera de los bancos de berberecho.

Con respecto a la afectación por neoplasia en función de la clase de talla/edad, la prevalencia de la enfermedad fue claramente mayor en los individuos adultos (1-2 años de edad) de talla comercial que en los berberechos juveniles correspondientes al reclutamiento del año en curso. En el caso de berberechos de Irlanda, Twomey & Mulcahy (1988a) describen una mayor prevalencia de neoplasia diseminada entre berberechos de talla menor (en especial machos) con respecto a berberechos mayores. Sin embargo, el rango de tallas que dichos autores consideran como pequeños se encuentra entre 28 y 30 mm; talla que en Galicia es la mínima de explotación comercial y que en el presente estudio se consideró como adulta. Estos autores no observan neoplasia en berberechos de tallas inferiores a 20 mm; en Galicia, sin embargo, se detectaron berberechos de talla significativamente menor (hasta 10 mm de longitud) afectados por la enfermedad. Con respecto a otras especies, Balouet *et al.* (1986), en un estudio de 6 años de seguimiento de neoplasia diseminada en ostras *Ostrea edulis* de la Bretaña francesa, describen un porcentaje mayor de afectación en ostras de más de 30

meses de edad y concluyen que el proceso de envejecimiento está relacionado con un incremento en la prevalencia de la enfermedad. Lo mismo concluye Bower (1989) en base a estudios de la prevalencia de neoplasia en *Mytilus edulis* de la Columbia Británica en Canadá. Sin embargo, Elston *et al.* (1992) en su revisión sobre neoplasia diseminada consideran la relación entre neoplasia y senescencia más hipotética que conclusiva y argumentan que existen abundantes observaciones en el medio natural que apoyan el rechazo de dicha hipótesis. Cooper *et al.* (1982b) encuentran en *Mya arenaria* que las almejas adultas presentan una prevalencia de neoplasia mayor en comparación con los juveniles. Appeldoorn *et al.* (1984) describen una mayor prevalencia de neoplasia en *M. arenaria* adultas que en almejas juveniles. Leavitt *et al.* (1990) cita las mayores tasas de afectación por neoplasia diseminada entre las almejas *M. arenaria* de 3-4 años de edad, con respecto a las almejas de menor y mayor edad. Potts *et al.* (1996) encuentran las mayores prevalencias de neoplasia diseminada en *M. arenaria* en las almejas de talla comprendida entre 40 y 70 mm, observando un incremento en la incidencia de neoplasia en una cohorte conforme crece hasta alcanzar dicho rango de tallas. Estos mismos autores describen también una mortalidad diferencial en función de la talla concluyendo que dicha acción puede alterar la distribución de tallas en las poblaciones naturales de *M. arenaria* afectadas. Weinberg *et al.* (1997) encuentran igualmente una menor afectación por neoplasia en las clases de talla de *M. arenaria* de menor tamaño, y una menor mortalidad en dicho grupo con respecto a almejas de talla mayor. Sin embargo, Christensen *et al.* (1974) citan en *Macoma balthica* un patrón de afectación completamente inverso, con mayores tasas de afectación de neoplasia del epitelio branquial en individuos de menos de 20 mm de longitud con respecto a individuos de talla mayor. Brooks y Elston (1991) citan una mayor susceptibilidad a la neoplasia en mejillones *Mytilus edulis* del primer año de vida, con respecto a mejillones de 2-3 años de edad. En el caso de neoplasia gonadal de *M. arenaria* de zonas afectadas por vertidos de hidrocarburos no se encuentra relación entre la edad y la susceptibilidad a la neoplasia (Yevich & Barszcz 1977).

Además de reducciones en la producción de los bancos de berberecho debido a la mortalidad asociada a la neoplasia diseminada, el rendimiento en carne de los berberechos es otro de los posibles efectos que la enfermedad puede acarrear de cara a la explotación comercial de este bivalvo. Los índices de condición pueden ser utilizados para evaluar disminuciones en la condición fisiológica (Farley 1977). En este aspecto, varios trabajos han abordado el estudio de la condición fisiológica de almejas *Mya*

*arenaria* afectadas por neoplasia, citando disminuciones progresivas en el peso seco de los tejidos y en el índice de condición conforme incrementaba la severidad de la enfermedad (Brown *et al.* 1979; Appeldoorn *et al.* 1984; Leavitt *et al.* 1990). Estos resultados concordaban con observaciones previas que citaban una apariencia acuosa y demacrada de los tejidos (Farley & Sparks 1969), una recesión del manto y una coloración pálida de la glándula digestiva (Farley 1969b) en bivalvos con estados avanzados de afectación por neoplasia. El daño estructural de los órganos, producido por la progresión de la neoplasia cuando ésta alcanza niveles de intensidad de afectación elevados, provoca una interrupción en el funcionamiento normal de los mismos y un perjuicio en los procesos metabólicos asociados (Leavitt *et al.* 1990). Aunque en el presente estudio se comprobó una tendencia similar, de disminución de los valores de índice de condición y de peso seco de los tejidos, en los berberechos afectados por niveles máximos de intensidad de afectación por neoplasia diseminada (categoría 4), con respecto a los individuos sanos, dicha tendencia no alcanzó nivel de significación estadística. El escaso número de berberechos detectados en la máxima categoría de intensidad de afectación por neoplasia probablemente haya imposibilitado la detección de dicha tendencia con la prueba estadística. Sería recomendable el cálculo de índices de condición de manera rutinaria en estudios de seguimiento posteriores, con el fin de verificar e incluso cuantificar la influencia de la neoplasia en la condición en diferentes períodos del año. Junto con la mortalidad, el patrón de variación de la condición fisiológica podría ser un criterio más a considerar en la planificación de la explotación comercial de los bancos de berberecho.



**VI. TREMATODOS DIGENEOS QUE AFECTAN A  
LAS POBLACIONES DE BERBERECHO  
*Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA**

---





## VI. TREMATODOS DIGENEOS QUE AFECTAN A LAS POBLACIONES DE BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA

### VI.1. RESUMEN

Se ha llevado a cabo un estudio de identificación de las principales especies de trematodos digeneos que afectan a las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* de la costa gallega. Se han aislado *in vivo* a partir de tejidos de berberecho: esporoquistes y cercarias de *Labratrema minimus* (Bucephalidea) que invaden la gónada; metacercarias no enquistadas de *Meiogymnophallus minutus* (Gymnophallidae) y *M. fossarum* conviviendo en un mismo hospedador pero ocupando microhábitats diferentes; y metacercarias de diferentes especies del género *Himasthla* (Echinostomatidae) enquistadas en el pie. Mediante microscopía electrónica de barrido se han descrito los detalles ultraestructurales externos de cercarias de *Labratrema minimus* y metacercarias de *Himasthla* spp. A partir del estudio de preparaciones histológicas de diferentes bancos de berberecho se discute la posible parasitación de *C. edule* por *Renicola roscovita*, *Psilostomum brevicolle*, *Gymnophallus choledochus* y *Monorchis parvus* (= *Cercaria cerastodermae* I). Se ha estudiado también la dinámica temporal de la parasitación por *Labratrema minimus* en tres bancos de berberecho diferentes (Villabril, Lombos do Ulla y Misela) y su relación con determinados parámetros ambientales; los resultados, sin embargo, no han sido concluyentes y no ha podido formularse un modelo general de infestación para todas las poblaciones estudiadas. En el caso de la población de berberecho de Misela se ha establecido la existencia de una correlación positiva significativa entre la prevalencia de parasitación y la temperatura atmosférica y del mar. En este mismo banco, se ha detectado también correlación positiva significativa con la salinidad, pero dicha correlación no resultó suficientemente sólida. En el presente estudio no se detectó ningún individuo de talla menor de 20 mm parasitado por *L. minimus*, mientras que los adultos presentaron una prevalencia del 26 %. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los índices de condición de berberechos sanos y parasitados por *L. minimus* pero sí se observó un incremento significativo en el peso seco de los tejidos de los berberechos parasitados.

## SUMMARY

Species of digenetic trematodes affecting cockle populations from Galician Rías were identified. Sporocysts and cercariae of *Labratrema minimus* (Bucephalidae) affecting the gonad; metacercariae of *Meiogymnophallus minutus* (Gymnophallidae) – enveloped by the host mantle below the hinge of the host-, and *M. fossarum* –free in the peripheral extrapallial space- coexisting in the same host; and metacercariae of different species of *Himasthla* (Echinostomatidae) encysted in the foot, were *in vivo* isolated from cockle tissues. Cercariae of *L. minimus* and metacercariae of *Himasthla* spp. were also characterised by scanning electronic microscopy. Based in the study of histological sections of cockles from different natural beds, the occurrence of parasitisms by *Renicola roscovita*, *Psilostomum brevicolle*, *Gymnophallus choledochus* and *Monorchis parvus* (= *Cercaria cerastodermae* I) is discussed. Temporal dynamics of infection by *L. minimus* sporocysts and their relationship with some environmental factors were also assessed in three natural beds (*Villabril*, *Lombos do Ulla* and *Misela*), but the results were not conclusive enough to permit an established general infection pattern. In *Misela* it was detected a significant positive correlation between the prevalence of *L. minimus* and air and seawater temperature. It was not observed any cockle with length lower than 20 mm affected by *L. minimus* but adult cockles of commercial size ( $L > 28$  mm) presented a prevalence of 26 %. Significant differences in condition indices between healthy and parasitised cockles there were not detected, but the latter presented higher tissue dry weights.

## VI.2. INTRODUCCIÓN

En el estudio de caracterización de los parásitos y alteraciones patológicas que afectan a los bancos gallegos de berberecho (capítulo III) se encontraron diferentes fases larvarias de trematodos digeneos, que se incluyeron en el grupo de los organismos parásitos más importantes desde el punto de vista de su patogenicidad. Se trataba fundamentalmente de esporoquistes invadiendo la masa visceral, metacercarias no enquistadas que aparecían envueltas por pliegues del borde del manto y metacercarias enquistadas en diferentes órganos y tejidos de berberecho (fundamentalmente pie, glándula digestiva, borde del manto y palpos). Sin embargo resultó imposible concretar de qué especies se trataba debido a que la histología no es la técnica más adecuada para la identificación de trematodos.

Existen referencias previas de poblaciones de berberecho afectadas por trematodos digeneos. Lauckner (1971) encuentra 11 especies de larvas de digeneos parasitando *C. edule* recolectados en llanuras intermareales del Mar del Norte y zonas someras de la costa alemana del Mar Báltico: metacercarias enquistadas de *Himasthla elongata*, *H. continua*, *H. interrupta* e *Himasthla* sp. (Familia Echinostomatidae); *Renicola roscovita* (Fam. Renicolidae); *Psilostomum brevicolle* (Psilostomatidae); una metacercaria no identificada similar a *Cercaria mytili* (Lebour 1911); metacercarias no enquistadas de *Meiogymnophallus minutus*, *Meiogymnophallus* sp. y *Gymnophallus gibberosus*; y esporoquistes de *Gymnophallus choledochus*. Russell-Pinto (1993) describe en la Ría de Aveiro (Portugal) 7 especies distintas de trematodos digeneos: esporoquistes de *Labratrema minimus* (Fam. Bucephalidae), *Gymnophallus choledochus* (Gymnophallidae) y *Cercaria cerastodermæ I* (Monorchidae); y metacercarias de *Meiogymnophallus minutus*, *M. fossarum* y *Gymnophallus rebecqui* (Gymnophallidae) e *Himasthla quissetensis* (Echinostomatidae). De Montaudouin *et al.* (2000) citan 9 especies distintas de trematodos digeneos parasitando *C. edule* de la Bahía de Arcachon (Francia). Esporoquistes de *Gymnophallus choledochus*, *Labratrema minimus* y *Monorchis parvus* (*Cercaria cerastodermæ I*); y metacercarias de *Himasthla continua*, *H. elongata*, *H. interrupta*, *Meiogymnophallus minutus*, *Psilostomum brevicolle* y *Renicola roscovita*.

Se han descrito larvas de trematodos en prácticamente todas las especies de bivalvos marinos y por tanto no parece una exageración considerar a los trematodos digeneos como el grupo de parásitos metazoos más importante de los moluscos bivalvos (Lauckner 1983). Algunas familias de trematodos digeneos, como Bucephalidae, Gymnophallidae o Monorchidae, afectan a una gran cantidad de especies de bivalvos marinos de valor comercial, causando castración, debilitamiento y, durante epizootias, altas mortalidades (Lauckner 1987; Jonsson & André 1992; Bowers *et al.* 1996) y por tanto importantes pérdidas económicas (Lauckner 1983).

Debido a la posible trascendencia que este grupo de parásitos puede tener, se aborda su estudio con el primer objetivo de aislar e identificar los trematodos digeneos más importantes que parasitan a *C. edule* de las Rías Gallegas. Asimismo, como los trematodos pertenecientes a la familia Bucephalidae se consideran uno de los grupos con mayor efecto patogénico (Lauckner 1983), se emprende el estudio de diferentes aspectos de la parasitación por esporoquistes de *Labratrema minimus* (Bucephalidae): (i) Dinámica temporal de la infestación y su relación con diferentes parámetros ambientales; (ii) Relación con la edad del hospedador; (iii) Efectos en la condición del berberecho.



## VI.3. MATERIAL Y MÉTODOS

### VI.3.1. Recolección de los berberechos y aislamiento de los trematodos

Para la realización del estudio de aislamiento e identificación de las principales especies de trematodos digeneos que afectan a *C. edule* de Galicia, se eligió el banco natural de Foz (N 43° 34', W 7° 15'; Figura VI.1). Dicha elección se basó en el hecho de que este banco presentaba prevalencias elevadas de todos los *tipos morfológicos* de trematodos que se diferenciaron mediante histología en el estudio realizado anteriormente, de caracterización de los parásitos y alteraciones patológicas de las poblaciones de berberecho de la costa gallega (capítulo III). Se recogieron berberechos de talla comercial (L>28 mm) normalmente enterrados, y también aquellos que aún vivos aparecían total o parcialmente desenterrados. Muestreando estos últimos se incrementaba la probabilidad de detectar y aislar un mayor número de especies de trematodos digeneos, ya que los bivalvos muy intensamente parasitados por trematodos ven disminuida su capacidad para llevar a cabo su actividad normal de enterramiento (Lauckner 1983; Jonsson & André 1992; Bowers *et al.* 1996; Desclaux *et al.* 2002, 2004). Los berberechos se trasladaron en un recipiente refrigerado hasta el laboratorio, donde fueron mantenidos vivos en un sistema cerrado de agua de mar hasta el momento de ser procesados. Dicho procesamiento consistió en una disección de los individuos bajo lupa binocular y examen de los diferentes órganos mediante microscopía óptica en busca de fases larvianas de trematodos digeneos. Las cercarias que aparecían en el interior de esporoquistes fueron liberadas mediante rotura de la pared de los mismos empleando una aguja. Estas cercarias se examinaron mediante microscopía óptica y se procesaron para su observación mediante microscopía electrónica de barrido con el fin de conocer sus características morfológicas específicas. Las metacercarias no enquistadas, que aparecieron tanto bajo la charnela envueltas por pliegues del borde del manto, así como libres en el espacio palial periférico, se aislaron y estudiaron mediante microscopía óptica. Los quistes de las metacercarias que aparecían enquistadas en el pie se aislaron rompiendo los tejidos con ayuda de una aguja y bajo lupa binocular. Después, se midió el diámetro de un conjunto de quistes tomados al azar a partir de diferentes berberechos hospedadores y, a continuación, las metacercarias contenidas dentro de los mismos fueron desenquistadas empleando la solución salina descrita por

Irwin *et al.* (1984). Las características morfológicas de las larvas desenquistadas fueron analizadas mediante microscopía óptica y electrónica de barrido.



**Figura VI.1:** Mapa de Galicia en el que se muestra la ubicación de los diferentes bancos de berberecho estudiados.\*: Foz. 1. Lombos do Ulla; 2. Misela; 3. Villabril.

### VI.3.2. Análisis de cortes histológicos

Alguno de los tipos larvarios observados en los cortes histológicos del trabajo de cartografía previo no fueron detectados y aislados *in vivo* entre los berberechos de Foz. Por ello se revisaron las preparaciones histológicas correspondientes a dicho trabajo, así como otras que se procesaron especialmente para el estudio de dinámica de infestación por esporoquistes de trematodos bucephalideos, con el fin de identificar en base a criterios histológicos las especies de trematodos en cuestión.

### **VI.3.3. Procesamiento de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Las cercarias y metacercarias fueron fijadas durante 2 h a 4 °C en glutaraldehído al 2,5 % en tampón de cacodilato sódico (pH 7,4), lavadas en tampón de cacodilato sódico a 4 °C durante 2 h más y sometidas a una postfijación durante 1 h a 4 °C en tetróxido de osmio tamponado al 1%. Después, sufrieron un proceso de deshidratación a través de una serie de alcoholes de graduación creciente (50-100 %) y se secaron al aire. Una vez montadas sobre soportes específicos se cubrieron con oro y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips XL30 operando a 12 kV.

### **VI.3.4. Dinámica de infestación por esporoquistes de *Labratrema minimus* (Bucephalidae)**

Las técnicas histológicas son un método adecuado para evaluar la prevalencia de infestación por esporoquistes de Bucephalidae, ya que –debido a la alta invasividad de los tejidos que éstos presentan– es muy fácil su detección por examen de cortes histológicos. Para llevar a cabo el estudio de la dinámica de parasitación por esporoquistes de *Labratrema minimus* (Bucephalidae) se realizó un seguimiento histopatológico de tres poblaciones de berberecho (Fig. VI.1):

1. *Misela* (N 42° 47', W 8° 55'), entre abril de 1999 y noviembre de 2000.
2. *Lombos do Ulla* (N 42° 38', W 8° 46'), de noviembre de 1999 a noviembre de 2000.
3. *Villabril* (N 43° 43', W 7° 41'), en el período comprendido entre abril de 2001 y abril de 2002.

Para ello se recolectaron muestras de 25 berberechos de talla comercial (L>28 mm) en los tres bancos citados con periodicidad mensual. Los berberechos se transportaron al laboratorio donde se mantuvieron en tanques con agua de mar en circuito cerrado alrededor de 24 horas con el fin de que liberasen la arena y otras partículas sólidas contenidas en su tracto digestivo y, tras lo cual, se realizó su procesamiento histológico, según el procedimiento ya descrito en el apartado III.3. Las preparaciones histológicas se examinaron al microscopio óptico con el fin de detectar la presencia de esporoquistes. Se registró el porcentaje de berberechos afectado para cada mes y banco muestreado.

### VI.3.5. Correlación con variables ambientales

Se estudió la existencia de relación entre la dinámica de parasitación de *Labratrema minimus* en los distintos bancos y determinadas variables ambientales. Para ello, en todos los bancos se emplearon los registros semanales de temperatura y concentración de clorofila *a* en la capa superficial (primeros 1,5 m de la columna de agua), procedentes de las estaciones de la red de control de condiciones oceanográficas del INTECMAR más próximas a los bancos de berberecho estudiados (*M3* y *M7*, para el caso de *Misela*; *A3*, para *Lombos do Ulla* y la estación oceanográfica secundaria de *O Barqueiro* para *Villabril*). Por problemas de calibración de las sondas del CTD no se dispuso de registros de salinidad y temperatura en la estación *M3* correspondientes a los meses de enero y febrero de 2000; ni del período octubre de 1999 y febrero de 2000, para el caso de la estación *A3*. Asimismo en el caso de *O Barqueiro*, al tratarse de una estación secundaria, sólo se dispuso de datos de temperatura y salinidad. Se consideraron también la temperatura media del aire y la precipitación mensual acumulada, registradas en las estaciones del INM de Noia y Vilagarcía, próximas a los bancos de *Misela* y *Lombos do Ulla*, respectivamente. No se dispuso de registros de dichas variables para el caso de *Villabril*. Para todas estas variables se computó el promedio correspondiente a los registros existentes entre fechas de muestreo. Se calcularon coeficientes de correlación por rangos de Spearman entre dichos valores y los de prevalencia mensual de parasitación en los distintos bancos para tratar de establecer relaciones entre la progresión de esta patología y dichas variables ambientales. Para ello se empleó la aplicación informática de estadística MINITAB 14.0.

### VI.3.6. Relación con la edad

En Octubre de 2001 se recolectaron en *Villabril* 50 individuos adultos de talla comercial ( $L > 28$  mm) y 50 juveniles (rango: 12-20 mm.), y se procesaron según el procedimiento histológico descrito anteriormente (sección III.3). Las preparaciones histológicas fueron examinadas con el fin de diagnosticar si existía parasitación por esporoquistes de *L. minimus*, calculándose el porcentaje de individuos afectados en cada clase de edad. Los datos resultantes fueron comparados mediante una tabla de contingencia aplicando la prueba estadística chi-cuadrado con el fin de concluir si existía asociación entre la prevalencia de infestación y la edad.

### VI.3.7. Efectos de la infestación por *L. minimus* en la condición de *C. edule*

Se recolectaron 100 berberechos adultos de talla comercial ( $L > 28$  mm) en el banco de *Villabril* en mayo de 2001, cuando la prevalencia de *L. minimus* era alta. Se registró el peso vivo total de cada berberecho y el peso húmedo sólo de los tejidos blandos de cada individuo. A continuación se extrajo una pieza de tejidos de unos 5 mm de espesor que fue procesada mediante técnicas histológicas convencionales (sección III.3), con el fin de diagnosticar si el individuo estaba parasitado por *L. minimus*. El resto de vianda de cada berberecho se pesó en fresco y después se sometió a un proceso de desecación en estufa ( $100^{\circ}\text{C}$  durante 24 h). Tras ello, se calculó para cada individuo la razón peso seco - peso húmedo, y dicho cociente se aplicó al peso húmedo total de la carne inicial para hallar su correspondencia en peso seco. La concha de cada individuo se sometió a secado en las mismas condiciones que la carne ( $100^{\circ}\text{C}$ , 24 h) y se pesó a continuación. Se calcularon dos índices de condición (Mann 1978; Lucas & Beninger 1985):

$$\text{IC}_{(i)} = \text{Peso seco carne} \times 100 / \text{Peso seco concha}$$

$$\text{IC}_{(ii)} = \text{Peso seco carne} \times 100 / (\text{Peso húmedo total} - \text{Peso seco concha})$$

Los índices de condición y los valores de peso seco de los individuos sanos y aquellos afectados por esporoquistes fueron comparados mediante tests no paramétricos de Kruskal-Wallis. Los berberechos afectados por neoplasia diseminada y focos grandes de infiltración hemocitaria fueron eliminados de la comparación para evitar interferencias en el estudio.

## VI.4. RESULTADOS

### VI.4.1. Especies de trematodos encontradas en berberechos de Galicia

Se comprobó que el berberecho *C. edule* de Galicia actúa como hospedador intermediario primario y como hospedador intermediario secundario de fases larvarias de diferentes especies de trematodos digeneos. Hubo asimismo coexistencia simultánea en el mismo individuo hospedador de fases larvarias de diferentes especies de trematodos. Se detectaron además metacercarias encerradas dentro de esporoquistes, lo que indica que las especies correspondientes emplean al berberecho como hospedador intermediario primario y secundario consecutivamente, lo cual constituye una rareza en el ciclo de vida normal de trematodos.

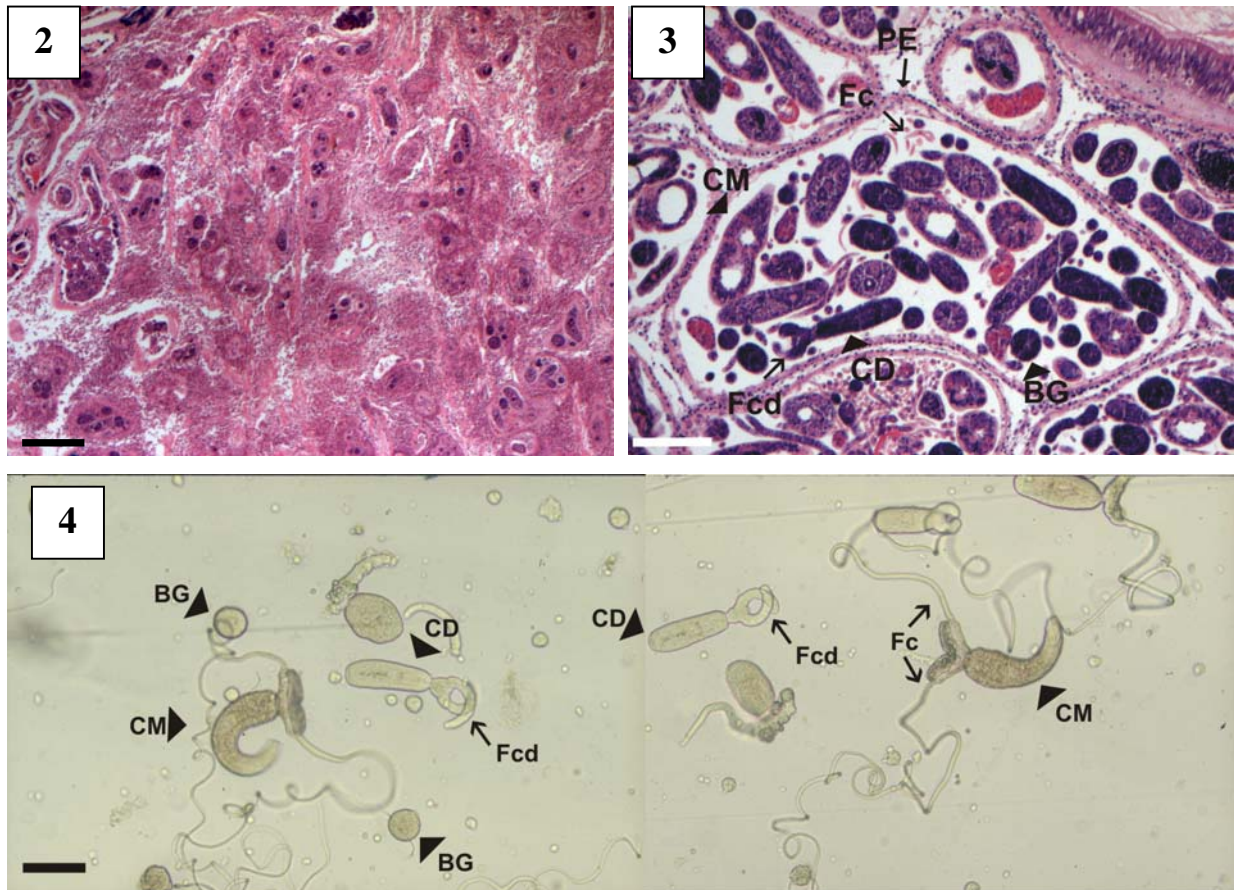
En el reconocimiento *in vivo* de los berberechos *Cerastoderma edule* se aislaron trematodos digeneos de tres familias: Bucephalidae, Gymnophallidae y Echinostomatidae. Además en las preparaciones histológicas se apreciaron parásitos trematodos pertenecientes al menos a tres familias más: Psilostomatidae, Rencolidae y Monorchidae.

A continuación se realiza una descripción de las especies de trematodos encontradas:

#### ***Labratrema minimus* (Stossich, 1887)**

Se detectaron esporoquistes de *L. minimus* (Fam. Bucephalidae) invadiendo la gónada de *C. edule*. Éstos eran de color entre crema y amarillo pálido, tubulares, con zonas de engrosamiento y estrangulamiento, muy ramificados y enmarañados con los tejidos del hospedador. El examen de los cortes histológicos reveló que invadían preferentemente el tejido gonadal, la glándula digestiva, y –en casos de alta intensidad de infestación– otros órganos como branquias y riñón. Como consecuencia de dicha infestación fue habitual la castración parcial o total de los individuos de *C. edule* afectados. Se observó cierta reacción hemocitaria de defensa por parte del hospedador, pero normalmente ésta fue muy ligera. En algún caso aislado se detectó infiltración hemocitaria intensa en forma de granulocitomas que aislaban a los esporoquistes y parecían digerirlos (Figura VI.2).

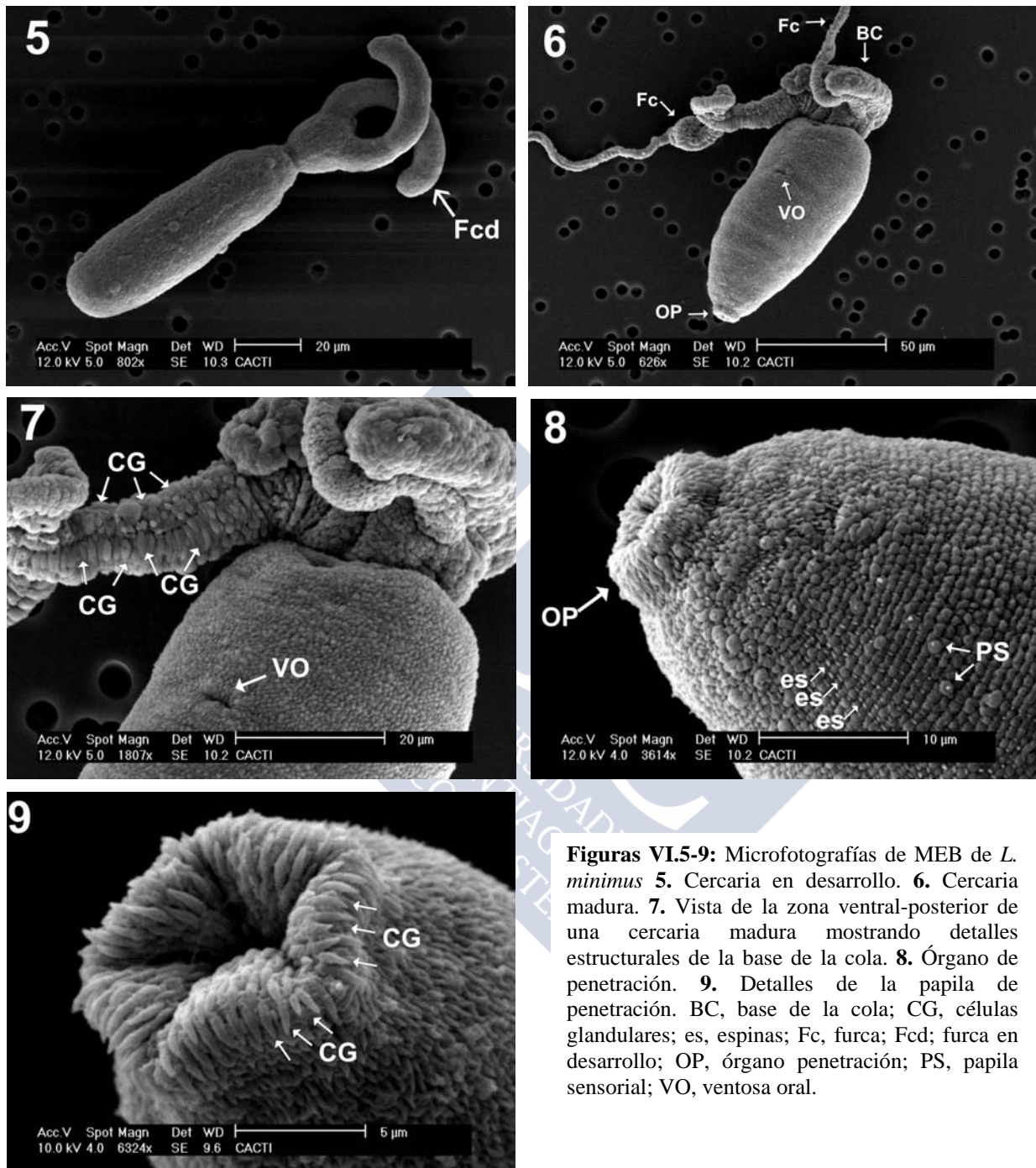




**Figuras VI.2-4:** Microfotografías de diferentes aspectos de *L. minimus*. **2.** Corte histológico de berberecho que muestra reacción hemocitaria intensa contra esporoquistes de *L. minimus*. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . **3.** Corte histológico de tejidos de berberecho afectados por esporoquistes de *L. minimus*. **4.** Frotis de esporoquiste mostrando cercarias en diferentes estadios de desarrollo. BG, bola germinal; CD, cercaria en desarrollo; CM, cercaria madura; Fc, furca; Fcd, furca en desarrollo.; PE, pared de esporoquiste. Barras en 3 y 4: 100  $\mu\text{m}$ .

Las zonas de engrosamiento de los esporoquistes presentaban en su interior cercarias en diferentes estados de desarrollo: bolas germinales, cercarias en desarrollo y cercarias maduras listas para ser emitidas (Figuras VI.3, 4, 5 y 6). Las cercarias maduras poseían la boca en la cara ventral del cuerpo, en la zona media, y una cola en la parte posterior formada por una base central y dos largas furcas muy contráctiles y de gran tamaño. El extremo anterior de la cercaria era más agudizado y en él se situaba el órgano cefálico o de penetración. (Fig. VI.6). Aunque resultó difícil la realización de mediciones –debido a la enorme capacidad de elongación y contracción de la cercaria al realizar sus movimientos de desplazamiento- se pudo determinar una talla media de  $296,6 \pm 51,96 \mu\text{m}$  (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=10$ ) de longitud y  $52,0 \pm 5,82 \mu\text{m}$  de anchura en su zona media. La cola era también muy contráctil, su base tenía unas dimensiones medias de  $90 \times 25 \mu\text{m}$  ( $n=10$ ), y cada uno de los dos filamentos que la

integraban presentaba un tamaño que excedía varias veces el tamaño corporal. Estos filamentos presentaban células glandulares agrupadas en dos filas (Figura VI.7).



El análisis mediante MEB reveló que el tegumento de la cercaria poseía una estructura reticulada y presentaba papilas sensoriales uniciliadas y espinas en la zona anterior del cuerpo (Fig. VI.8). El órgano de penetración (o rhynchus) de la cercaria en el hospedador intermediario secundario se ubicaba en extremo anterior del cuerpo y

presentaba abundantes células glandulares y un margen exterior ligeramente lobulado con su porción interior evaginable (Fig. VI.9).

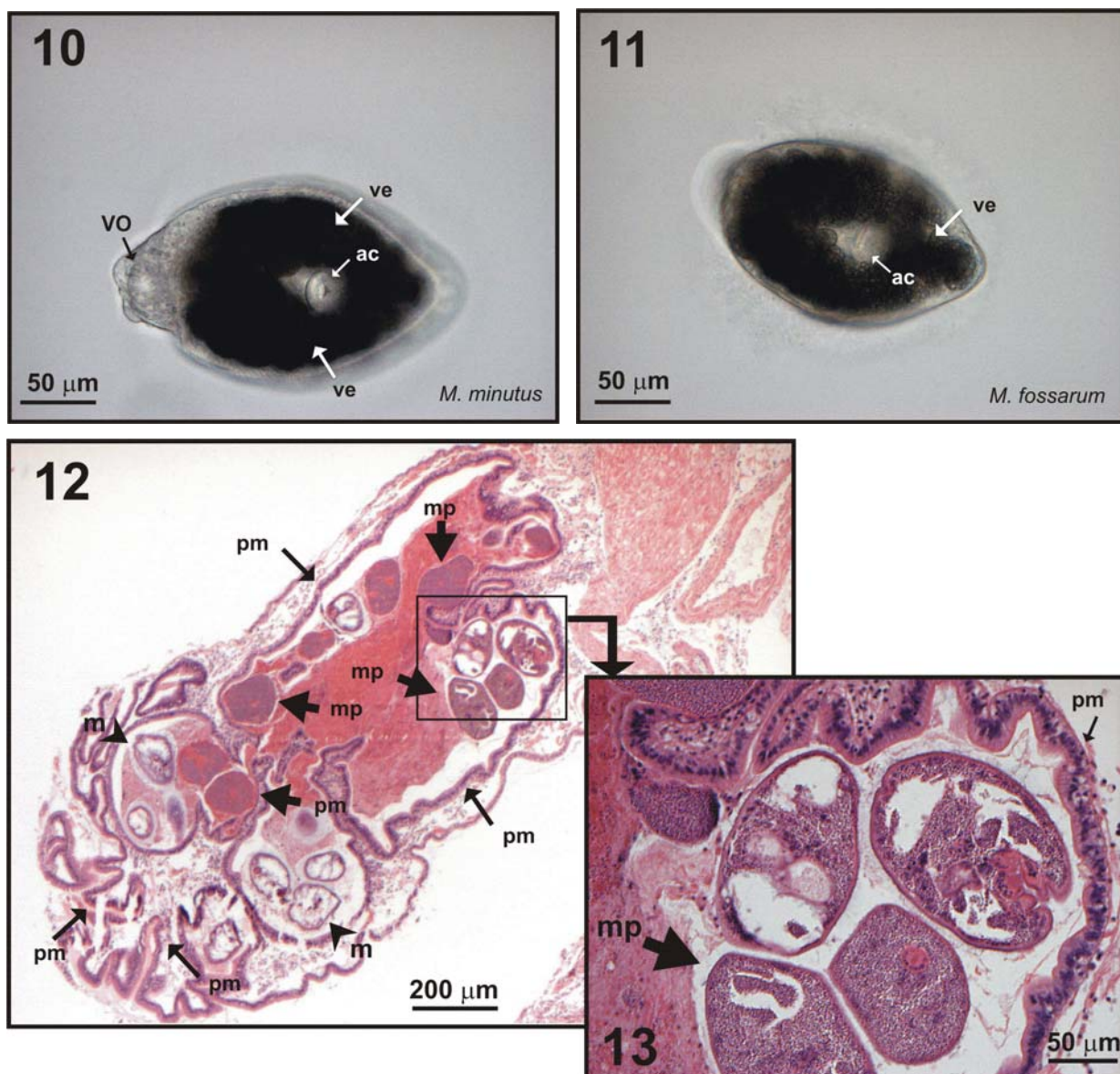
***Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859) y *Meiogymnophallus fossarum* (Bartoli, 1965)**

Estas especies de la Familia Gymnophallidae fueron identificadas en base a la alta especificidad de sus microhábitats dentro del hospedador (Russell-Pinto 1990a,b; Russell-Pinto & Bartoli 1992; Bowers *et al.* 1996) y no fue necesaria la realización de estudios ultraestructurales para su distinción (Russell-Pinto & Bowers 1998).

Se detectaron metacercarias no enquistadas de *Meiogymnophallus minutus* y *M. fossarum* coexistiendo en individuos de *Cerastoderma edule*. Las metacercarias de *M. minutus* fueron observadas envueltas por pliegues del tejido del manto, formando una masa blanquecina de cierto aspecto calcáreo bajo la charnela del hospedador. Las metacercarias de *M. fossarum* se localizaron libres entre los pliegues del manto a lo largo del istmo paleal de la concha, es decir, en el espacio palial periférico.

La morfología de la metacercaria de ambas especies era prácticamente idéntica, presentando una forma elipsoidal cuando era observada *in vivo* mediante microscopía óptica (Figuras VI.10 y 11). Se distinguieron dos ventosas: una bucal a nivel terminal anterior, y otra ventral o acetábulo. Se apreció también la vesícula excretora como una masa oscura de forma circular dispuesta en la zona media corporal. En *M. minutus* las proyecciones anteriores de la vesícula excretora llegaban justo hasta el margen posterior de la ventosa oral, y no cubrían normalmente la ventosa ventral. En *M. fossarum* ambas ventosas aparecían cubiertas por dichas proyecciones de la vesícula excretora (Fig. VI.10 y 11). Las metacercarias de *M. minutus* aparecían frecuentemente parasitadas por un organismo tipo microsporidio, que provocaba un aumento significativo del tamaño de la larva y la destrucción de sus órganos internos; en casos extremos la metacercaria conservaba únicamente el tegumento externo conteniendo en su interior las esporas del organismo tipo microsporidio (Figuras VI.12 y 13). La mayoría de las larvas afectadas estaban muertas, careciendo de movilidad y presentaban al microscopio óptico un color blanco opaco o castaño denso.



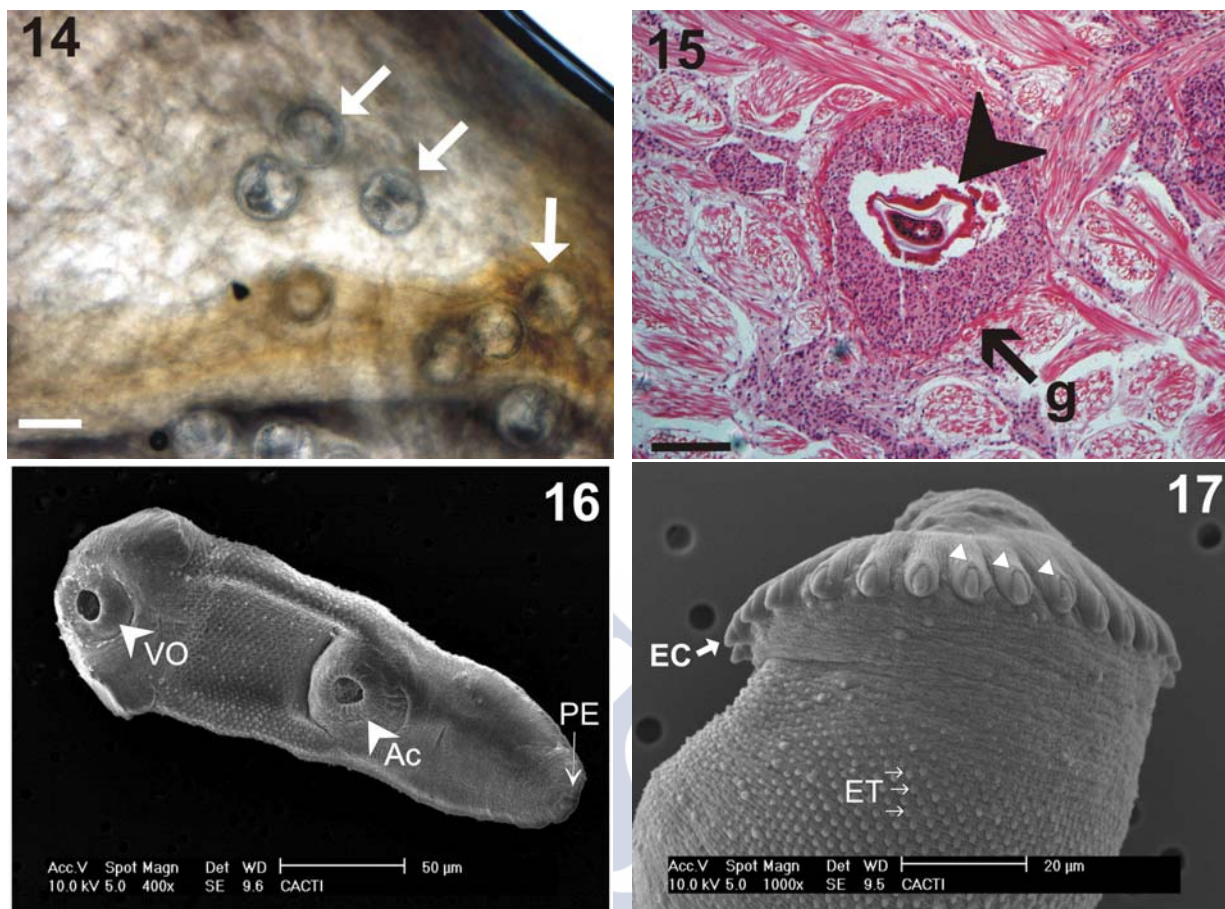


**Figuras VI.10-11:** Microfotografías *in vivo* de *M. minutus* y *M. fossarum*. Ac, acetabulum; ve, vesícula excretora; vo, ventosa oral.

**Figuras VI.12-13:** 12. Corte histológico de metacercarias de *M. minutus* envueltas por pliegues del manto de *C. edule*. 13. Ampliación de la Fig. 12 mostrando metacercarias parasitadas por un organismo tipo microsporidio. m, metacercaria; mp, metacercaria parasitada; pm, proliferaciones del manto.

### ***Himasthla* spp.**

Se detectaron metacercarias del género *Himasthla* (Fam. Echinostomatidae) enquistadas en el pie de *Cerastoderma edule* (Figura VI.14). A través del examen de cortes histológicos se observó en ciertos casos una reacción hemocitaria de defensa por parte del hospedador que consistió en el desarrollo de granulocitomas envolviendo y aislando el quiste de la metacercaria (Fig. VI.15) y llegando a digerir al mismo en algunos casos.



**Figura VI.14:** Microfotografía *in vivo* de metacercarias de *Himasthla* spp. (flechas) enquistadas en pie de berberecho. Barra: 200  $\mu$ m. **Figura VI.15:** Corte histológico en la que se aprecia reacción hemocitaria defensiva contra una metacercaria de *Himasthla* sp. enquistada en pie de berberecho. Punta de flecha: quiste; g, granulocitoma. Barra: 100  $\mu$ m. **Figuras VI.16-17:** Microfotografías de MEB de metacercarias de *Himasthla* spp. desenquistadas. **16.** Visión global de la morfología corporal. Ac, acetabulum; PE, poro excretor; VO, ventosa oral. **17.** Vista dorso-anterior, mostrando la estructura del collar de espinas cefálicas. EC, espinas cefálicas; ET, espinas tegumentarias. Las puntas de flecha señalan los pliegues de tejido en el interior de los cuales se alojan las espinas cefálicas cuando están retraídas.

Los diámetros de los quistes estaban comprendidos entre 182 y 263  $\mu$ m y se distinguieron tres grupos de quistes en función de su diámetro, que tiene carácter taxonómico para discriminar especies dentro del género: (1)  $204,2 \pm 9,6$   $\mu$ m (media  $\pm$  desviación estándar), con una frecuencia del 80% (55 quistes de 69 contabilizados y medidos); (2)  $242,7 \pm 10,8$   $\mu$ m: 16% de frecuencia (11 quistes de 69); (3)  $184,0 \pm 3,2$   $\mu$ m: 4% de frecuencia (3 de 69).

Las metacercarias desenquistadas estudiadas mediante MEB presentaban un cuerpo alargado, de sección cilíndrica y con una depresión longitudinal en la zona ventral comprendida entre el extremo anterior y la zona media del cuerpo. Se

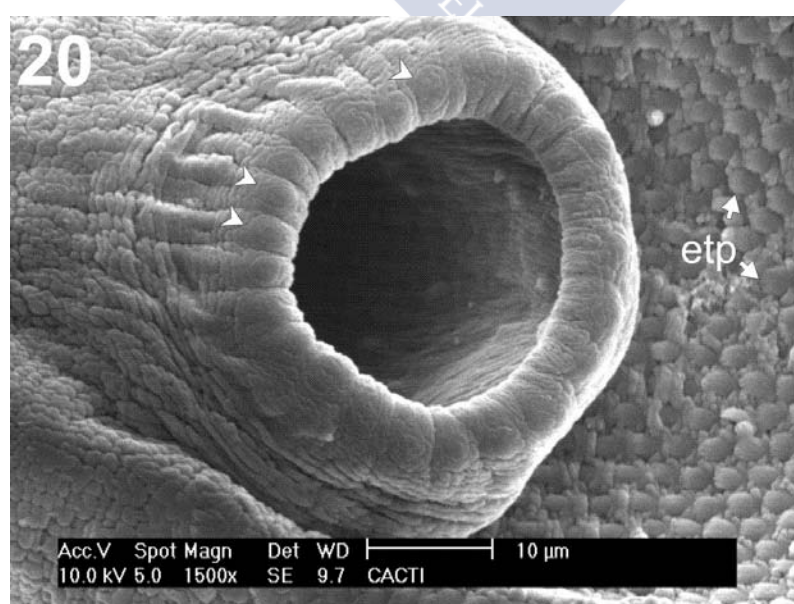
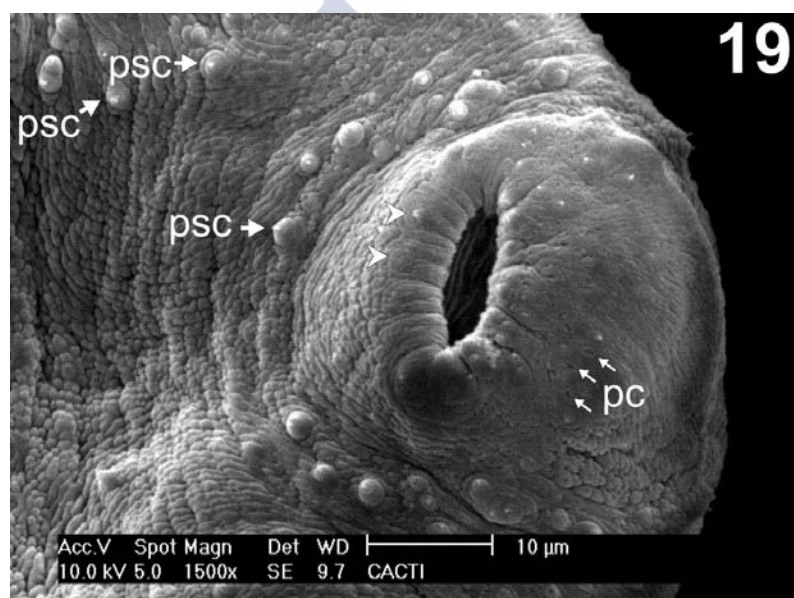
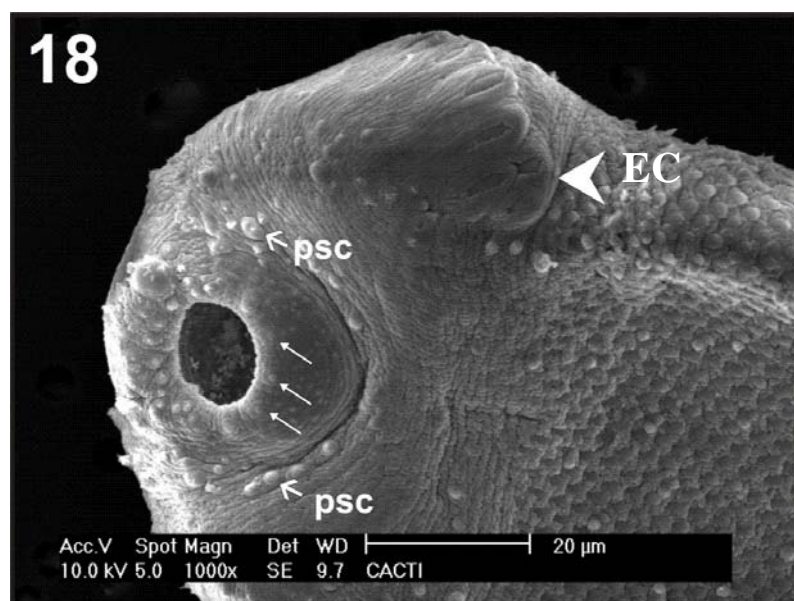
observaron dos ventosas: una oral, en una posición anterior terminal y rodeada por un collar de espinas cefálicas, y otra mayor, denominada acetabulum, en una posición medio ventral. Se observó también un poro excretor en el extremo posterior del cuerpo (Fig. VI.16). Las espinas cefálicas se disponían en una sola fila formando un collar que estaba abierto a nivel de la zona ventral (Figs. VI.17 y 18). Las espinas que integraban cada uno de los extremos finales del collar estaban flaqueadas a cada lado por dos espinas más pequeñas. Las espinas cefálicas de estas metacercarias recientemente desenquistadas no eran siempre visibles, apareciendo a veces retraídas en el interior de unos pliegues de tejido (Fig. VI.18). Se distinguieron de manera clara numerosas papilas sensoriales unciliadas alrededor de los labios de la ventosa oral (Figs. VI.18 y 19). Se observaron también otro tipo de estructuras con forma discoidal y de menor tamaño, probablemente con función sensorial, a nivel de la superficie del tegumento alrededor de las ventosas oral y ventral (Figs. VI.19 y 20). En la zona dorsal del labio de la ventosa oral se apreciaron una serie de poros aparentemente ciegos (Fig. VI.19). Toda la superficie de la metacercaria desde la zona inmediatamente posterior al collar cefálico hasta la región de la ventosa ventral aparecía recubierta por espinas tegumentarias, si bien éstas no estaban presentes en la región posterior del cuerpo. Las espinas tegumentarias de las zonas anterolateral y dorsal parecían más largas que anchas (Fig. VI.17), apreciándose una tendencia progresiva hacia una morfología más plana conforme se avanzaba hacia la zona posterior del cuerpo (Fig. VI.20).

### Otros trematodos

En cortes histológicos de algunos berberechos se observaron metacercarias de sección circular enquistadas en glándula digestiva. El diámetro de los quistes presentó un rango muy amplio de variación, oscilando entre 187 y 304  $\mu\text{m}$  (Fig. VI.21). Se observaron también metacercarias de diámetro medio inferior ( $126,2 \pm 27,4 \mu\text{m}$ ,  $n=5$ ) enquistadas en el borde del manto y palpos labiales (Fig. VI.22).

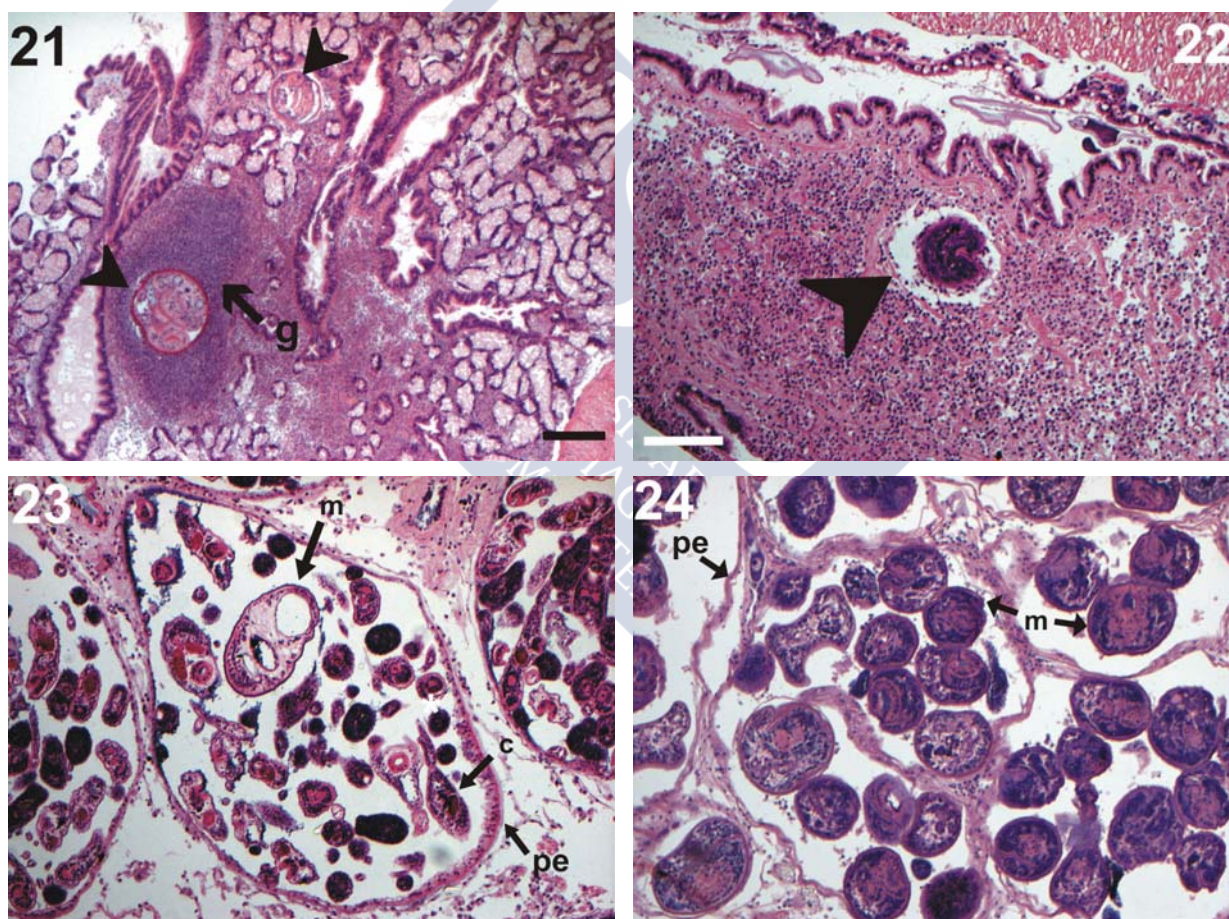
**Figuras V.18-20 (página siguiente):** Microfotografías de MEB mostrando detalles de las ventosas oral y ventral de metacercarias de *Himastha* spp. desenquistadas. **18.** Vista ventral del extremo anterior del cuerpo mostrando las espinas cefálicas en estado de retracción y la disposición de las papilas sensoriales alrededor de la ventosa oral. Las flechas señalan probables papilas sensoriales tegumentarias de forma discoidal. **19.** Detalles de la ventosa oral. **20.** Detalles de la ventosa ventral o acetabulum. Las puntas de flecha muestran probables órganos sensoriales de forma discoidal; EC, espinas cefálicas; etp: espinas tegumentarias palmoidales; pc, poros ciegos; psc, papilas sensoriales ciliadas.





En cortes histológicos correspondientes a un único berberecho de *Foz* se observaron esporoquistes de morfología diferente de los de *Labratrema minimus* previamente descritos (Fig. VI.23). Estos esporoquistes se encontraban parasitando la gónada y contenían en su interior cercarias con la cola bifurcada y metacercarias no enquistadas de longitud media:  $150,8 \pm 15,3 \mu\text{m}$  (n=10).

Asímismo, a lo largo del estudio de la dinámica de infestación de *L. minimus* realizado en el banco de *Villabril*, se localizaron dos berberechos afectados por esporoquistes que contenían en su interior metacercarias enquistadas con un diámetro medio de  $91,2 \pm 5,3 \mu\text{m}$  (n=10). Estos esporoquistes invadían el tejido gonadal – causando castración parcial o total del hospedador-, la glándula digestiva, el pie y la branquia (Fig. VI.24).



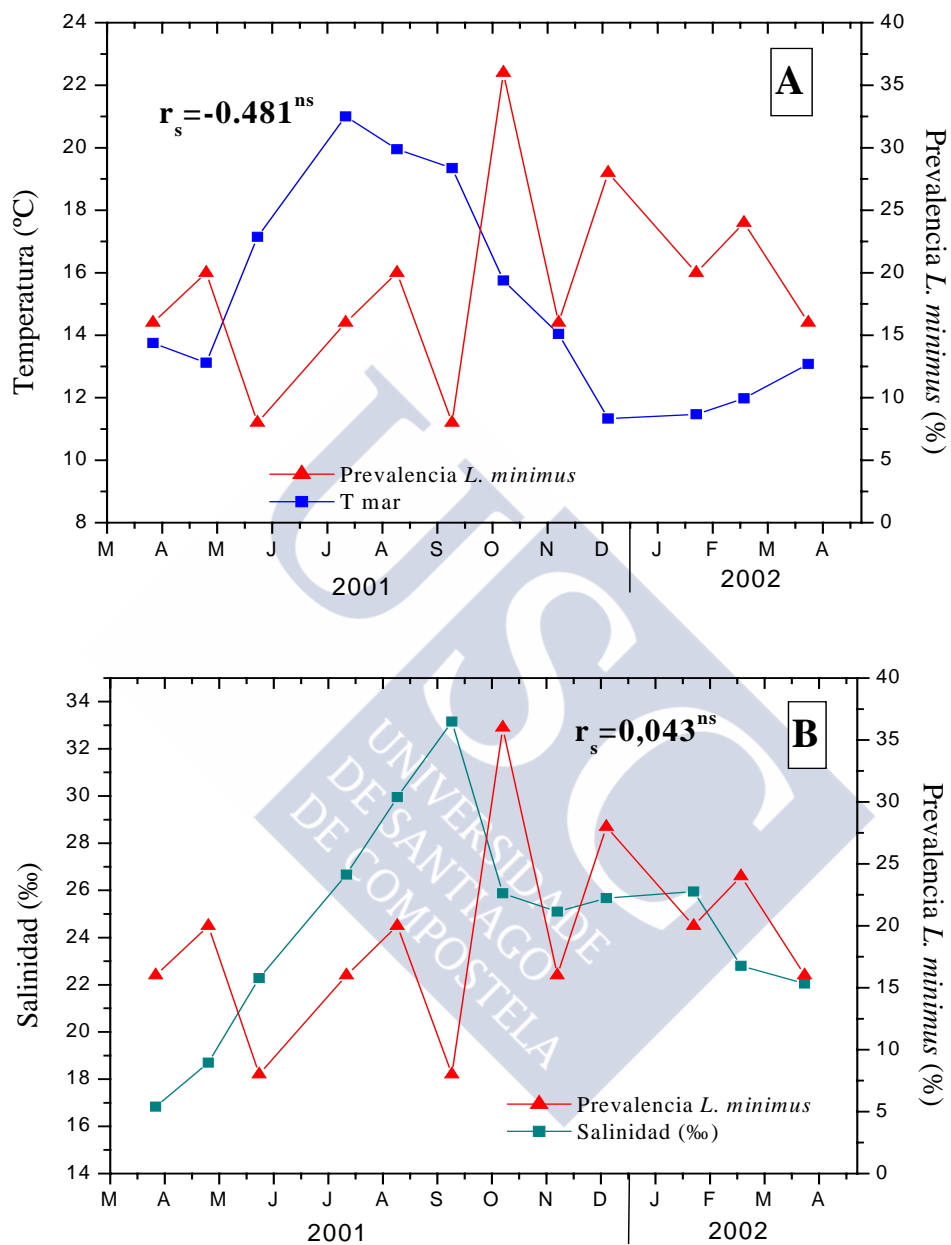
**Figuras VI.21-24:** Cortes histológicos de otros trematodos que afectan a los berberechos gallegos. **21.** Corte histológico de glándula digestiva de berberecho afectada por quistes de metacercarias correspondientes probablemente a *Psilostoma brevicolle*. Puntas de flecha: quistes; g, granulocitoma. Barra:  $200 \mu\text{m}$ . **22:** Metacercaria (punta de flecha), probablemente de *Renicola roscovita*, enquistada en palpo labial de *C. edule*. Barra (válida también para 23 y 24):  $100 \mu\text{m}$ . **23.** Esporoquistes probablemente pertenecientes a *Gymnophallus choledochus* albergando en su interior cercarias y metacercarias no enquistadas. c, cercaria; m, metacercaria; pe, pared del esporoquiste. **24.** Esporoquistes con metacercarias enquistadas en su interior, probablemente pertenecientes a *Monorchis parvus* (*Cercaria cerastodermae* I). m, metacercarias; pe, pared esporoquiste.



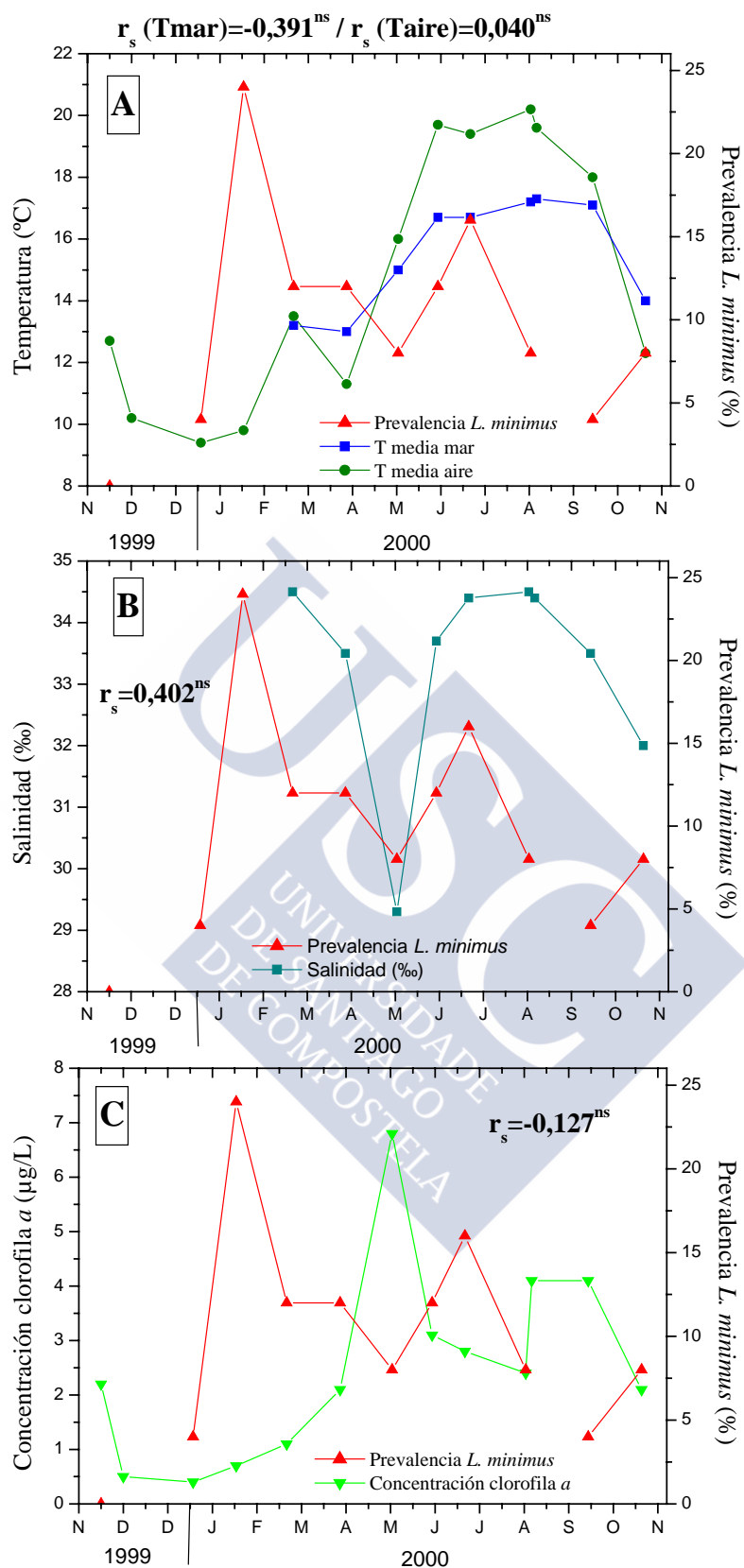
#### **VI.4.2. Dinámica de infestación por *Labratrema minimus*. Correlación con variables ambientales**

La mayor prevalencia media de parasitación por *L. minimus* fue detectada en *Villabril*, con un valor medio de 19,3 % a lo largo de 12 meses de seguimiento; *Lombos do Ulla* tuvo una prevalencia media de 9,8 % correspondiente a 11 muestras mensuales; los berberechos de *Misela* fueron los que presentaron una menor prevalencia media: 5,1 % en 21 muestras mensuales de seguimiento.

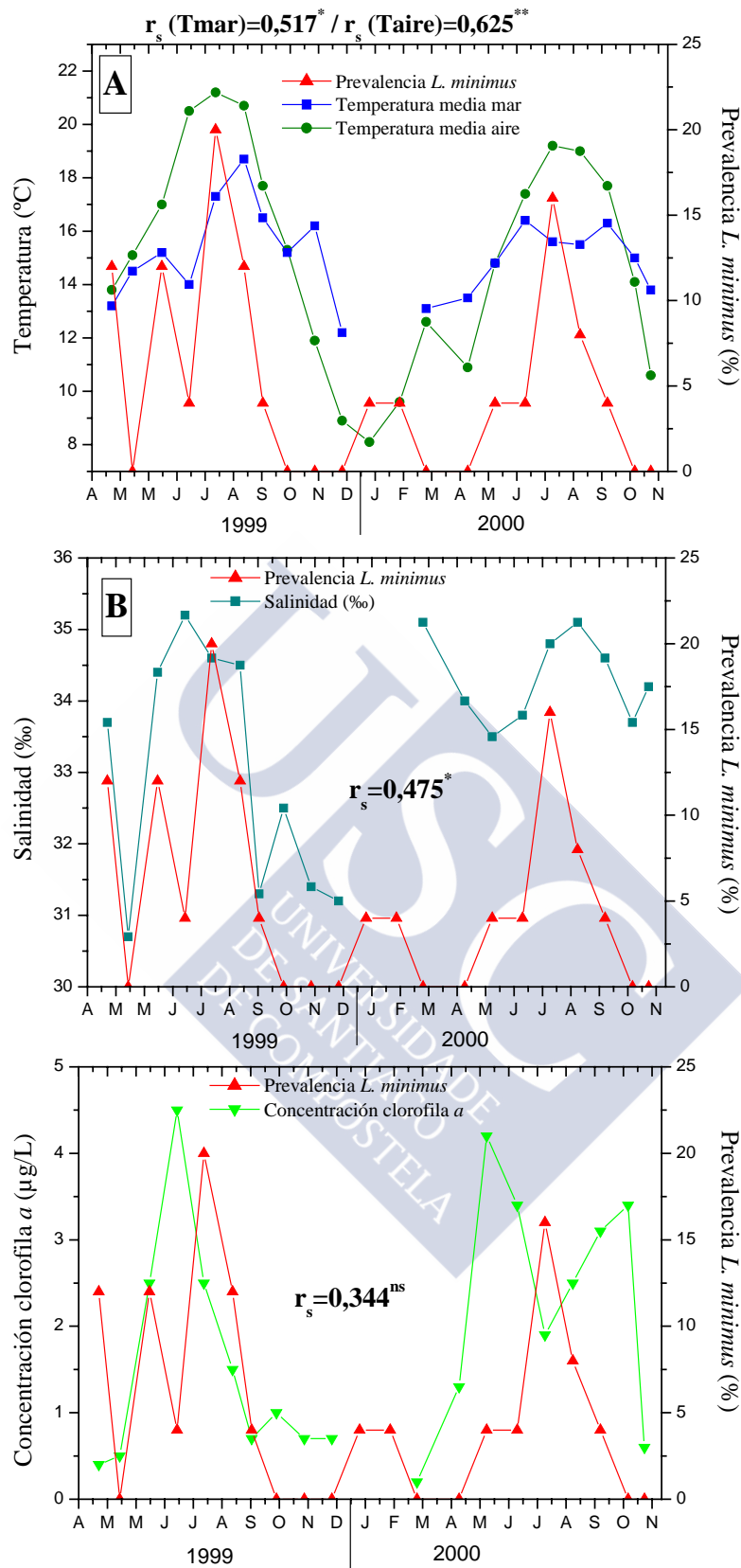
La prevalencia de esporoquistes en *Villabril* osciló entre un valor mínimo del 8 % en los meses de junio y septiembre de 2001, y un máximo de 36 % en octubre del mismo año. La variación temporal de la prevalencia no mostró ningún patrón claro de estacionalidad, no existiendo correlación alguna con la temperatura y la salinidad del agua de mar (Figura VI.25). La prevalencia en *Lombos do Ulla* osciló entre 0 y 24 %. No se observó ningún patrón claro de estacionalidad ni correlación significativa con las variables ambientales analizadas (Figura VI.26). La prevalencia osciló entre 0 y 20 % en *Misela*. Se observaron dos picos de prevalencia en agosto de 1999 y agosto de 2000. En las otras muestras mensuales (excepto en abril y junio de 1999) no se detectaron esporoquistes de *L. minimus* o éstos presentaron valores muy bajos de prevalencia. La variación temporal de la prevalencia no siguió un patrón estacional claro, excepto por la coincidencia de dos máximos de parasitación en agosto de dos años consecutivos. En este banco, se detectó una correlación significativa con la temperatura del aire ( $r_s=0,625$ ,  $P=0,002$ ), con la temperatura del agua de mar ( $r_s=0,517$ ,  $P=0,024$ ) (Figura VI.27.A) y con la salinidad ( $r_s=0,475$ ,  $P=0,040$ ) (Figura VI.27. B), por orden de importancia. No existió correlación con la concentración de clorofila *a* (Figura VI.27.C).



**Figura VI.25:** Variación mensual de la prevalencia de *L. minimus* y de (A) la temperatura media del mar, y (B) la salinidad en Villabril durante el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



**Figura VI.26:** Variación mensual de la prevalencia de *L. minimus* y de (A) la temperatura media del mar y del aire, (B) la salinidad; y (C) la concentración de clorofila *a* en Lombos do Ulla durante el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



**Figura VI.27:** Variación mensual de la prevalencia de *L. minimus* y de (A) la temperatura media del mar y del aire, (B) la salinidad; y (C) la concentración de clorofila *a* en Misela durante el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



#### VI.4.3. Relación con la edad

Entre el grupo de berberechos de edad mayor (longitud antero-posterior >28 mm) se detectaron 13 individuos parasitados por esporoquistes de *L. minimus*, lo que supone una prevalencia del 26 %, mientras que ningún berberecho apareció parasitado entre el grupo de los juveniles (L<20 mm).

#### VI.4.4. Efectos de la infestación por *L. minimus* en la condición de *C. edule*

Se analizaron un total de 78 berberechos después de descartar 22 ejemplares por presentar neoplasia o focos grandes de infiltración hemocitaria. La prevalencia de parasitación por *L. minimus* fue del 21,8 % (17 berberechos parasitados). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de índice de condición entre berberechos parasitados y no parasitados ( $P>0.05$ ). Sin embargo, los berberechos afectados por esporoquistes de *L. minimus* tenían valores de peso seco de los tejidos significativamente mayores que los berberechos sanos ( $P=0.034$ ; Tabla VI.1).

**Tabla VI.1:** Valores medios ( $\pm$  error estándar) de dos índices de condición y de peso seco de vianda correspondientes a berberechos de *Villabril* sanos y parasitados por esporoquistes de *L. minimus*.

Categorías	Número de individuos examinados	IC <sub>(i)</sub>	IC <sub>(ii)</sub>	Peso seco (g)
Sanos	61	5,72 $\pm$ 0,18	6,89 $\pm$ 0,27	0,339 $\pm$ 0,013
Parasitados	17	5,43 $\pm$ 0,16	6,90 $\pm$ 0,39	<b>0,385 <math>\pm</math> 0,019</b>
Total	78			

## VI.5. DISCUSIÓN

El berberecho *Cerastoderma edule* es un organismo hospedador de una gran variedad de organismos simbioses (Lauckner 1983; Bower *et al.* 1994; de Montaudouin *et al.* 2000; Carballal *et al.* 2001). En el presente estudio se han detectado 10 especies diferentes de trematodos digeneos afectando a las poblaciones gallegas de berberecho. Así, se aislaron *in vivo* a partir de tejidos de berberecho: esporoquistes y cercarias de *Labratrema minimus* (Bucephalidae); metacercarias no enquistadas de *Meiogymnophallus minutus* y *M. fossarum* (Gymnophallidae) coexistiendo en el mismo hospedador pero ocupando microhábitats diferentes; y quistes de metacercarias del género *Himasthla* (Echinostomatidae) que probablemente correspondían a 3 especies diferentes. Se observaron también en preparaciones histológicas metacercarias enquistadas, probablemente de *Psilostomum brevicolle* y *Renicola roscovita*; y esporoquistes que contenían metacercarias en su interior probablemente de *Gymnophallus choledochus* y de *Monorchis parvus* (*Cercaria cerastodermæ* I). Todas las especies encontradas, así como otras que no han sido detectadas en este estudio, ya habían sido descritas en *Cerastoderma edule* con anterioridad en diferentes ámbitos geográficos (Lauckner 1971; Russel-Pinto 1993; de Montaudouin *et al.* 2000).

Los esporoquistes y cercarias de Bucephalidae observados afectando la gónada y otros órganos de *C. edule* de Galicia coinciden totalmente con descripciones previas de *Labratrema minimus* (James *et al.* 1966; Deltreil & His 1970). Las características morfométricas concordaron con los márgenes definidos anteriormente por otros autores para esta especie (Deltreil & His 1970; Matthews 1973; Maillard 1975). La observación mediante microscopía electrónica de barrido permitió describir con detalle el tegumento de la cercaria y sus estructuras ornamentales. Estas observaciones concordaron con las realizadas por Russell-Pinto (1993) en *Labratrema minimus* de *C. edule* de la Ría de Aveiro (Portugal).

El efecto patológico más claro de *Labratrema minimus* fue la castración parcial o total del hospedador. Cortes histológicos de berberechos afectados revelaban la ocupación parcial o completa del tejido gonadal por esporoquistes de *L. minimus*, siendo imposible en muchos casos determinar el sexo del hospedador. Este efecto es habitual en todos los bivalvos afectados por esporoquistes de Bucephalidae (Cheng 1967; Lauckner 1983; Lasiak 1991, 1993; Coustau *et al.* 1993; Calvo-Ugarteburu & McQuaid 1998a). A pesar de la severa patología asociada a las infestaciones por

trematodos bucephalideos, es habitual que la reacción de respuesta por parte del hospedador sea mínima (Lauckner 1983). Esto se corresponde con nuestras observaciones en cortes histológicos de berberechos parasitados, pues fueron minoritarios los casos en los que se observaba una reacción intensa de tipo hemocitario contra los esporoquistes de *L. minimus*. La infestación por *Labratrema minimus* puede reducir significativamente la resistencia global del hospedador a condiciones de estrés medioambiental (Bowers 1969). Desclaux *et al.* (2002) estima que *L. minimus* puede ser responsable de la emergencia hacia la superficie del sustrato de un 9% de los berberechos normalmente enterrados.

Metacercarias no enquistadas de *Meiogymnophallus minutus*, envueltas por pliegues del tejido del manto bajo la charnela, fueron correctamente identificadas por primera vez en *C. edule* del sur de Gales (Bowers & James 1967). Lauckner (1971) observó también estas metacercarias en *C. edule* del Mar del Norte y Báltico. *M. minutus* presenta una enorme especificidad por su hospedador intermediario secundario, lo que es bastante inusual en la fase de metacercaria (Lauckner 1983). Metacercarias de *M. fossarum*, libres en el espacio extrapaleal, fueron descritas por primera vez en *C. glaucum* de lagunas costeras abiertas del Mar Mediterráneo (Bartoli 1965). Ambas especies utilizan el molusco bivalvo *Scrobicularia plana* como primer hospedador intermediario, y el ostrero *Haematopus ostralegus* como hospedador final. *M. minutus* y *M. fossarum* han sido descritas coexistiendo en el mismo hospedador, pero ocupando sus respectivos microhábitats, en *C. edule* de la Ría de Aveiro, Portugal (Russell-Pinto 1990a,b), sugiriendo que el aislamiento ecológico debido al hecho de ocupar microhábitats diferentes en el hospedador pudo dar lugar a un proceso de especiación simpátrida (Russell-Pinto 1990a,b; Russell-Pinto & Bartoli 1992; Bowers *et al.* 1996). En el caso de los berberechos gallegos, las poblaciones están constituidas mayoritariamente por individuos de *C. edule*. En la población estudiada (Foz) se han encontrado conviviendo en el mismo hospedador metacercarias de ambas especies, *Meiogymnophallus minutus* y *M. fossarum*, ocupando los microhábitats propios de cada una en el hospedador previamente definidos. Las características morfológicas y morfométricas se ajustaron a lo previamente descrito por otros autores (Bowers *et al.* 1996). Constituye una novedad observar dicha convivencia de especies en un mismo hospedador en una latitud más al norte de lo descrito hasta el momento.

Bowers & James (1967) identificaron como *Nosema* sp. el microsporidio hiperparásito de *M. minutus* en *C. edule* de aguas Británicas. La descripción que dichos autores proporcionan de las metacercarias afectadas se corresponde con las observaciones realizadas en el presente trabajo. Este microsporidio fue posteriormente reclasificado como *Unikaryon legeri* (Canning & Nicholas 1974). Este hiperparásito de berberecho fue descrito en *C. edule* de otras situaciones geográficas, como la Ría de Aveiro en Portugal (Azevedo & Canning 1987; Russell-Pinto 1993) o en el estuario del Exe, en el sur de Inglaterra (Goater 1993). Probablemente el microsporidio detectado en los berberechos gallegos sea la misma especie, *Unikaryon legeri*. La hiperparasitación de larvas de trematodos por microsporidios puede tener importancia práctica y económica, puesto que al acabar con ellas impide que tengan lugar daños mayores en el hospedador (Lauckner 1983).

Entre las larvas de digeneos que se enquistan en bivalvos, el género *Himasthla* (Fam. Echinostomatidae) constituye uno de los grupos de mayor importancia. Su cercaria se desarrolla en redias en moluscos gasterópodos, y los adultos parasitan el intestino de aves costeras. Asimismo fases larvarias de Echinostomatidae, incluyendo al género *Himasthla*, han estado implicadas en molestias gastrointestinales en humanos después del consumo de bivalvos crudos (Lauckner 1983). Estudios previos verificaron que el diámetro del quiste es un parámetro que permite discriminar especies del género *Himasthla* y, por tanto, tiene valor taxonómico (Stunkard 1938; Loos-Frank 1967; Lauckner 1983; de Mountaudouin *et al.* 1998, 2000; Jensen *et al.* 1999). En base a dicho valor taxonómico y al enorme rango de diámetros de quiste registrado en el presente estudio, se concluye que las metacercarias enquistadas en el pie de la población de *C. edule* estudiada pertenecen a diferentes especies de *Himasthla*. Aplicando dicha correspondencia entre diámetro de quiste y caracterización específica, las especies de *Himasthla* parásitas de *C. edule* de Foz más frecuentes fueron *H. continua* y *H. elongata*, respectivamente. La menor prevalencia correspondió a quistes de  $184,0 \pm 3,2$   $\mu\text{m}$  de diámetro, medidas que se encuentran comprendidas dentro del rango (140-190  $\mu\text{m}$ ) de diámetro de quiste de *H. quissetensis* (Stunkard 1938). *H. quissetensis*, sin embargo, difiere del resto de especies de *Himasthla* descritas en berberecho en el número de espinas cefálicas que componen el collar que rodea la ventosa oral (31 en *H. quissetensis* vs. 29 en el resto de especies). Puesto que este hecho no pudo ser precisado en el presente estudio, no es posible caracterizar a qué especie corresponden los quistes comprendidos dentro de este rango de talla.

Los efectos patológicos de *Himasthla* pueden ser realmente importantes, originando una respuesta intensa por parte del hospedador que normalmente consiste en granulocitomas, integrados por hemocitos e incluso fibras, alrededor del quiste. Una invasión de metacercarias intensa puede causar alteraciones en la estructura muscular del pie originando disfunciones en la capacidad normal de enterramiento (Lauckner 1983; Jensen *et al.* 1999). Desclaux *et al.* (2002) responsabiliza a *H. quissetensis* del 2 % de los berberechos que aparecen desenterrados en el banco de La Canelette de la Bahía de Arcachon (SW Francia). Como consecuencia se produce un incremento en la mortalidad al resultar arrastrados los berberechos por las corrientes, por incremento de la depredación por parte de las aves (Lauckner 1983) y también porque permanecen expuestos al calor y la desecación durante los períodos de bajamar (Lauckner 1987). Más del 46 % de la mortalidad de berberecho en el banco de La Canelette está relacionado con infecciones de *H. quissetensis* (Desclaux *et al.* 2004).

Existen estudios previos sobre la ultraestructura tegumentaria de fases larvarias (Chapman & Wilson 1970; Irwin *et al.* 1984) y de estados juveniles en desarrollo (Han *et al.* 2003) de diferentes especies del género *Himasthla*. Las observaciones ultraestructurales sobre *Himasthla* sp. parásito de berberechos gallegos, realizadas en el presente estudio, concuerdan con observaciones previas descritas en dichos trabajos. El hecho de que las espinas cefálicas estuviesen a veces retraídas fue ya descrito por Irwin *et al.* (1984) en metacercarias de *H. leptosoma*; los pliegues de tejido en los que se repliegan las espinas se mencionan también para juveniles de *H. alincia* (Han *et al.* 2003). Asimismo, para metacercarias de *H. leptosoma* y *H. alincia*, estos autores describen dos tipos de papilas sensoriales: un primer tipo con forma abultada y con un corto apéndice tipo cilio que se proyecta en su zona central, y un segundo tipo en forma de pequeños discos en la superficie del tegumento. Irwin *et al.* (1984) sólo cita estos órganos en la region adyacente a la ventosa oral de la metacercaria de *H. leptosoma*. Chapman y Wilson (1970) en cercarias de *H. secunda*, y Han *et al.* (2003) en juveniles de *H. alincia*, encuentran papilas sensoriales también en la inmediaciones de la ventosa ventral. En el presente estudio se pudo distinguir con claridad el tipo de papila abultado e uniciliado, también pudieron ser observados pequeños discos alrededor de las ventosas oral y ventral; sin embargo, debido a que no se consiguieron ángulos adecuados de observación en las imágenes de microscopía electrónica de barrido, no se puede concluir si estas estructuras coinciden con el segundo tipo de papilas sensoriales

previamente descrito. Otra observación coincidente con las descripciones de Irwin *et al.* (1984) fueron los poros ciegos presentes al dorso de la ventosa oral. Este autor los relaciona con restos de las glándulas cistógenas empleadas por la fase cercaria para penetrar en el hospedador intermediario secundario y que una vez sufrida la metamorfosis en metacercaria dan lugar a estos poros. Asimismo también se confirma en el presente estudio la gradación estructural de las espinas tegumentarias, desde formas más agudas en la zona anterior del cuerpo a formas más planas hacia la zona media (Irwin *et al.* 1984; Han *et al.* 2003). Sin embargo, a pesar de todas las observaciones realizadas, la ignorancia acerca de la especie/s sobre la que se realizaba el examen ultraestructural (debido a que se trabajó con un conjunto de quistes seleccionados al azar a partir de diferentes berberechos) constituye una importante limitación pues no es posible profundizar en una discusión acerca de diferencias ultraestructurales entre metacercarias derivadas de quistes de diámetro diferente.

Con respecto a las metacercarias observadas únicamente en preparaciones histológicas, enquistadas en la glándula digestiva en un caso y en los palpos labiales y borde del manto en el otro, no podemos ser concluyentes en su identificación debido a que no han sido aisladas *in vivo*. Basándonos en los órganos parasitados y en el rango de tallas en lo que a diámetro de quiste se refiere, probablemente se trate de metacercarias de *Psilostomum brevicolle* en el primer caso, y de *Renicola roscovita*, en el segundo. Estas especies han sido descritas habitualmente parasitando dichos órganos en *C. edule* del Mar del Norte (Lauckner 1971, 1983) y de la costa atlántica francesa (de Montaudouin *et al.*, 2000). Además, el amplio rango de tallas encontrado se explicaría por el hecho de que el quiste de ambas especies presenta crecimiento en el interior de su hospedador secundario (Lauckner 1983).

Los esporoquistes de tipo morfológico diferente de los de *Labratrema minimus* encontrados en cortes histológicos correspondientes a un único berberecho de *Foz* probablemente correspondan a *Gymnophallus choledochus*. La morfología de las cercarias que aparecen en su interior (tipo furcocerca) y el hecho de que en el interior de algunos esporoquistes aparecen metacercarias no enquistadas, concuerdan con descripciones previas de esta especie (Lauckner 1983; Russell-Pinto 1993). *Gymnophallus choledochus* es una especie perteneciente a la familia Gymnophallidae, con un ciclo de vida que permite alternar su hospedador intermediario secundario en respuesta a las condiciones ambientales (Lauckner 1983).



Las metacercarias enquistadas en el interior de esporoquistes, encontradas en cortes histológicos de dos berberechos recogidos en *Villabril*, es muy probable que pertenezcan a la especie *Monorchis parvus* (= *Cercaria cerastodermæ* I). Esta especie fue descrita por primera vez parasitando *C. edule* de los estuarios del Támesis en el Reino Unido (Sannia *et al.* 1978). Recientemente su ciclo de vida ha sido completado y reclasificada como *Monorchis parvus* (Bartoli *et al.* 2000). Nuestras observaciones sobre la estructura de los esporoquistes, el diámetro de los quistes y la existencia de metacercarias enquistadas en el interior de esporoquistes concuerdan con las descripciones de Sannia *et al.* (1978) para esta especie. La baja frecuencia con que se ha encontrado concuerda con las bajas prevalencias normalmente citadas para esta especie (Sannia & James 1978), por lo que ha sido considerado como un parásito raro de *C. edule* (Lauckner 1983). Sin embargo, en 1991 se describe en la costa noroccidental de Suecia (Jonsson & André 1992) un evento extraordinario de mortalidad de berberecho asociado a prevalencias de un 20 % de este trematodo. Este hecho indica que este parásito puede alcanzar prevalencias elevadas y originar mortalidades en el hospedador debido a los severos daños causados en el mismo.

La existencia de patrones estacionales en la prevalencia de esporoquistes de Bucephalidae que afectan a bivalvos marinos no está clara. Algunos autores no encuentran patrones estacionales de infestación (Heasman *et al.* 1996; Calvo-Ugarteburu & McQuaid 1998b), mientras que otros citan patrones de infestación que no son independientes de la estación (Bowers 1969; Deltreil & His 1970; Lasiak 1993). Un patrón bien definido de estacionalidad de infestación fue encontrado en *C. edule* de Gales (Reino Unido) afectado por *Cercaria bucephalopsis haimeana* (= *Labratrema minimus*) con máximos de infestación (15 % de prevalencia) en los meses de verano (Bowers 1969). Deltreil & His (1970) definen un patrón de parasitación para *L. minimus* en berberechos de la Bahía de Arcachon (Francia) caracterizado por la existencia de infestación sólo desde primavera hasta finales del otoño, apareciendo los berberechos libres del parásito el resto del año. Los resultados del estudio de dinámica de parasitación por *L. minimus* en berberechos gallegos no son concluyentes, debido en parte al corto período de tiempo estudiado, resultando imposible la formulación de un modelo general de infestación para todas las poblaciones estudiadas. Así, en el caso de las poblaciones de *Villabril* y *Lombos do Ulla* no se detectó estacionalidad alguna en la infestación. En *Misela* se detectaron los valores máximos anuales de prevalencia en el mes de agosto, durante dos años consecutivos. Este hecho concordó adecuadamente con

las observaciones de Bowers (1969), resultando incluso similares los máximos de prevalencia de afectación. Este autor relaciona dicho patrón estacional con el ciclo reproductivo del berberecho, de manera que la parasitación por *L. minimus* se detecta en berberechos que ya han liberado sus gametos. En el capítulo IX, se abordará el análisis de la dinámica temporal de parasitación de *L. minimus* en relación con el ciclo de desarrollo gonadal. Conviene adelantar aquí que, en el caso de *Misela*, los picos máximos de prevalencia coincidieron con momentos de liberación de gametos de forma masiva, por lo que el fenómeno de puesta puede constituir un factor de estrés que incrementa la susceptibilidad de los berberechos. En el presente estudio se ha establecido la existencia de una correlación positiva significativa entre la prevalencia de parasitación y la temperatura (atmosférica y del mar), en el caso de la población de berberecho de *Misela*, de tal manera que parece que los máximos de temperatura propios de los meses estivales favorecen el desarrollo de la enfermedad. En este mismo banco, se ha detectado también correlación positiva significativa con la salinidad; sin embargo, el hecho de que no se dispusiese de registros continuos de salinidad durante todo el período de estudio, que el coeficiente de correlación fuese inferior a 0,5 y que los valores de probabilidad de aceptación de la hipótesis nula estuviesen muy próximos del límite de significación (0,05), limitan la solidez de este resultado. Los valores medios de prevalencia descritos se encuadraron en el rango descrito por diferentes autores para *L. minimus* (Hancock & Urquhart 1965; Bowers 1969; Deltreil & His 1970; Russell-Pinto 1993) y para otros esporoquistes bucephalideos (Lasiak 1993; Heasman *et al.* 1996). Normalmente valores elevados de prevalencias se corresponden con áreas resguardadas (Lasiak 1991). Dicha observación concuerda con los resultados del presente estudio, ya que *Villabril* es el banco de menor energía hidrodinámica, y *Misela* el de mayor exposición.

Existen numerosas referencias bibliográficas de incrementos en la prevalencia y/o intensidad de infección por parte de trematodos bucephalideos cuanto mayor es la edad del hospedador (Bowers 1969; Lauckner 1983; Lasiak 1991, 1993; Heasman *et al.* 1996; Calvo-Ugarteburu & McQuaid 1998a). En el caso de la población gallega de berberecho estudiada, afectada por *Labratrema minimus*, dicho hecho fue confirmado. Así, no se detectó ningún individuo parasitado de talla menor de 20 mm, mientras que los adultos alcanzaron una prevalencia del 26 %. Dichas observaciones concuerdan perfectamente con las de Bowers (1969) que, tras el análisis de casi 5000 individuos a

lo largo de un año, no encontró jamás ningún berberecho infectado menor de 18 mm de longitud y un año de edad.

Los índices de condición han sido considerados buenos indicadores del “*estado de salud*” de bivalvos, aunque pueden estar afectados por muchos factores entre los que se incluye la exposición a parásitos. Los resultados de estudios previos sobre los efectos de las infecciones por Bucephalidae en la condición han sido un tanto contradictorios. Bowers (1969) describe un aumento en índices de condición volumétricos de berberechos parasitados por esporoquistes de *Labratrema minimus*. Gauthier *et al.* (1990) encuentra que ostras afectadas por *Bucephalus* sp. presentan menores valores de índice de condición. Heasman *et al.* (1996) menciona que el peso medio de la gónada de *Pecten fumatus* es significativamente mayor en vieiras parasitadas por *Bucephalus* sp. Calvo-Ugarteburu & McQuaid (1998a) no encuentran ningún efecto aparente de los esporoquistes bucephalideos sobre *Perna perna* antes de la puesta, pero sí detectan un efecto negativo significativo tras la puesta. En el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los índices de condición de berberechos sanos y parasitados por *L. minimus*. Sin embargo, sí se observó un incremento significativo en el peso seco de los tejidos de los berberechos parasitados, probablemente debido al efecto de la biomasa de los trematodos que afectan a dichos tejidos. Esta observación parece concordar con los resultados de Bowers (1969); sin embargo, el estudio del efecto sobre la condición en un período post-puesta podría contribuir a un mejor entendimiento del efecto de la parasitación por esporoquistes de *Labratrema minimus* en *Cerastoderma edule*.



**VII. ENFERMEDAD DE LOS FOCOS GRANDES DE  
INFILTRACIÓN HEMOCITARIA INTENSA  
(FGIHI) QUE AFECTA AL BERBERECHO  
*Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA**

---







## **VII. ENFERMEDAD DE LOS FOCOS GRANDES DE INFILTRACIÓN HEMOCITARIA INTENSA (FGIHI) QUE AFECTA AL BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA**

### **VII.1. RESUMEN**

Se ha abordado la caracterización de la enfermedad de los FGIHI mediante el análisis de cortes histológicos con microscopio óptico y de cortes ultrafinos con MET. Los FGIHI consistían en numerosas masas de hemocitos, grandes y muy densas, que afectaban a diferentes órganos, originando en casos de intensidad alta la pérdida de la arquitectura normal de los tejidos y una extensa destrucción de tejidos y órganos. Algunos de los hemocitos integrantes de los focos contenían fagocitadas en su interior una o dos células no identificadas; éstas no presentaron características distinguibles que recordasen a ninguno de los parásitos previamente descritos afectando a los berberechos gallegos. A nivel ultraestructural, se observaron grandes depósitos de material denso a los electrones en el citoplasma de algunas células integrantes de los focos. En el interior del citoplasma y dentro de los depósitos densos a los electrones se apreciaron partículas de tipo vírico dispuestas en estructura paracristalina que podrían pertenecer a la familia Picornaviridae. No resultó posible concretar si la respuesta inflamatoria respondía a dichas partículas víricas o si éstas constituían una infección secundaria del hospedador debido a su posible debilitamiento.

Los FGIHI presentaron niveles epizooticos a lo largo de todo el año aunque no se observó estacionalidad ni correlación con la temperatura, salinidad y concentración de clorofila *a*. Se observaron disminuciones bruscas de la prevalencia que podrían ser consecuencia de la muerte de individuos afectados, lo que reafirmaría la consideración de elevada patogenicidad conferida a esta enfermedad en trabajos previos. La prevalencia de FGIHI fue mayor entre los individuos de más de un año de edad, pertenecientes a la clase de tamaño comercial, que entre los individuos juveniles. Se confirmó una disminución significativa de la condición en aquellos berberechos con niveles elevados de intensidad de FGIHI con respecto a los individuos sanos.

## SUMMARY

The pathological condition of the cockle *Cerastoderma edule* characterised by the occurrence of large foci of heavy hemocytic infiltration (LFHHI) was studied analyzing histological sections of affected cockles under light microscope and ultrathin sections using transmission electron microscope. LFHHI consisted in numerous, large, dense masses of hemocytes affecting different organs and involved loss of the normal architecture and extensive destruction of tissues and organs. Some of the hemocytes occurring in the foci contained 1 or 2 unidentified cells; these phagocytosed cells did not resemble any of the parasites previously described in Galician cockles. Ultrastructural examination showed large deposits of electron dense material in the cytoplasm of some cells occurring in the foci. Virus-like particles in paracrystalline arrays resembling Piconaviridae particles were seen in the cytoplasm and within these electron dense deposits. It was not possible to ascertain if these virus-like particles evokes the inflammatory response or they were a secondary infection owing to host debilitation.

LFHHI disease was detected at epizootic levels during all the period studied but any seasonal pattern there were not detected. Progression of the disease seems independent of air and sea temperature, salinity and chlorophyll *a* concentration. Sudden important drops in LFHHI prevalence were observed and probably as consequence of the death of affected cockles. LFHHI was more prevalent in older cockles (>1 year old) than in juvenile ones. Condition was significantly lower in cockles with high intensity levels of the disease than in healthy ones.

## VII.2. INTRODUCCIÓN

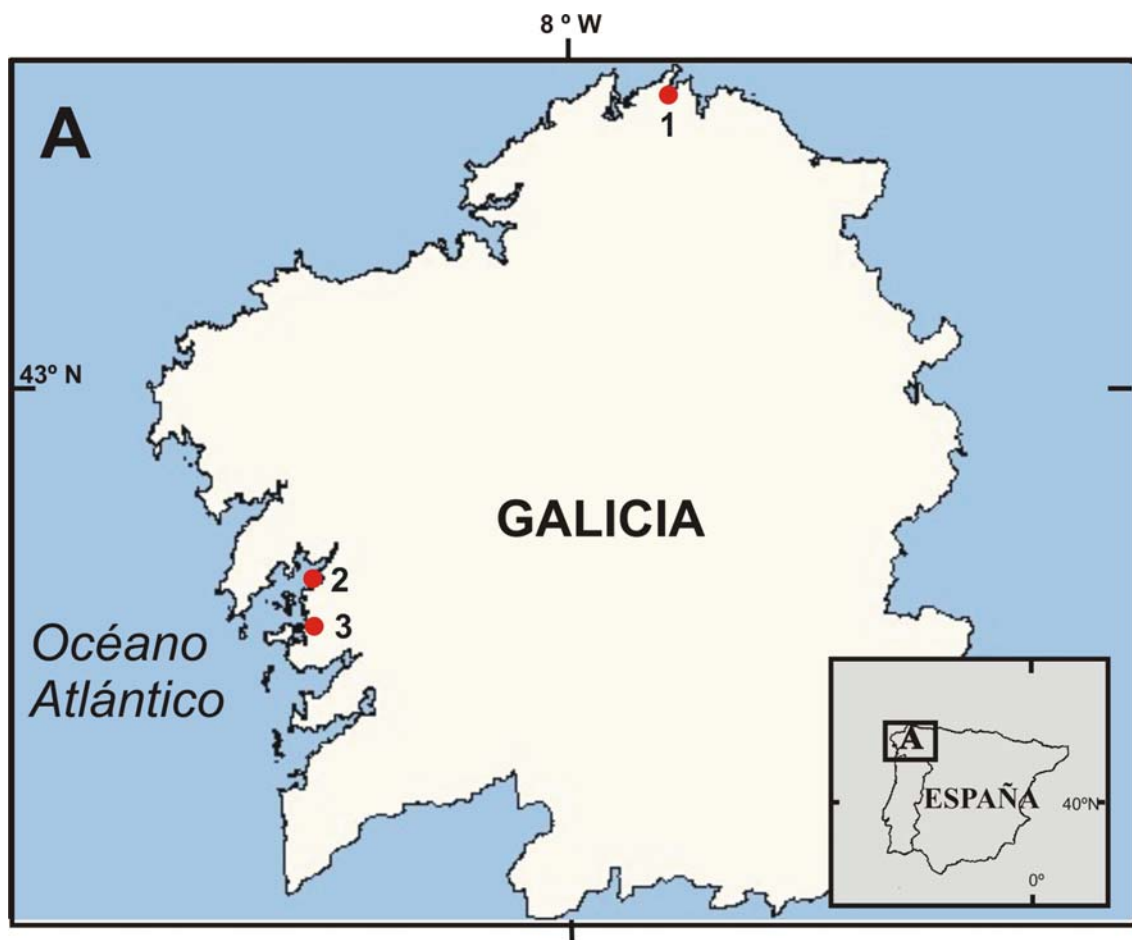
En 1997 se detectó un episodio de elevada mortalidad en algunos bancos de berberecho *Cerastoderma edule* de las *Rías Altas* de Galicia. El análisis histopatológico de berberechos de las zonas afectadas reveló que la mortalidad posiblemente estaba asociada con dos alteraciones patológicas de elevada patogenicidad: neoplasia diseminada y una alteración caracterizada por la presencia de focos grandes de infiltración hemocitaria intensa (FGIHI) en diferentes órganos. Se observó la presencia de células no identificadas que aparecían fagocitadas en el interior de los hemocitos que integraban los FGIHI. Si bien no fue posible precisar su naturaleza, se podría tratar de un parásito protista o de células alteradas del propio berberecho (Villalba *et al.* 2001). El trabajo de cartografía de los principales parásitos y alteraciones patológicas de los principales bancos de berberecho de Galicia, efectuado en 1999, reveló que esta alteración aparecía también afectando a otros importantes bancos de berberecho de las rías gallegas (capítulo III de la presente tesis) y se incluyó entre las más patogénicas de las que afectan a *C. edule* de Galicia.

Los objetivos de este estudio fueron: (i) realizar la caracterización histológica y describir los efectos patológicos de los FGIHI; (ii) analizar ciertos aspectos epizootiológicos de los FGIHI, como la dinámica temporal de desarrollo, la posible influencia de las condiciones ambientales y la edad del berberecho en la susceptibilidad del mismo a esta alteración; y (iii) evaluar los efectos de los FGIHI en el rendimiento en carne del berberecho.

## VII.3. MATERIAL Y MÉTODOS

### VII.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI

Con el fin de caracterizar la enfermedad de los FGIHI, se tomaron muestras de berberechos de tres bancos en los que se detectaron prevalencias elevadas de esta patología (informes internos Xunta de Galicia): *Villabril* (Cofradía de O Vicedo), *Carril* (Cofradía de Carril) y *Sarrido* (Cofradía de Cambados) (Figura VII.1). Las muestras se procesaron mediante técnicas clásicas de histología y mediante microscopía electrónica de transmisión.



**Figura VII. 1:** Poblaciones naturales de berberecho muestreadas para el estudio de diferentes aspectos de la enfermedad de los FGIHI. 1. *Villabril* (Cofradía de O Vicedo), 2. *Carril* (Cofradía de Carril); 3. *Sarrido* (Cofradía de Cambados).

#### VII.3.1.1. Análisis de cortes histológicos

Los berberechos recolectados en los bancos anteriormente mencionados se mantuvieron refrigerados durante su transporte al laboratorio, donde se dispusieron en tanques con agua de mar filtrada en circuito cerrado hasta el día siguiente, con el fin de permitir la eliminación de sedimento y otras partículas sólidas existentes en el aparato digestivo. A continuación se procedió según el protocolo histológico descrito en el apartado III.3 de esta memoria. Algunos de los cortes histológicos se tiñeron empleando tricómico de Mallory (Howard & Smith 1983) para verificar si había fibras alrededor o en el seno de los focos de infiltración. En el caso de berberechos de *Villabril*, recolectados en febrero de 2001, se extrajeron adicionalmente pequeñas piezas (1-2 mm de grosor) de tejido y se fijaron en solución de Carson (Pearse 1980). Esta solución mantiene los tejidos en un estado de conservación adecuado para su posterior procesamiento y estudio mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión,

durante el tiempo necesario para que la diagnosis histológica previa de los individuos tenga lugar. En el caso de seis berberechos de *Villabril*, efectivamente diagnosticados como afectados por FGIHI y procesados para su observación mediante MET, se realizaron, además, dos cortes histológicos: uno, que se tiñó mediante la reacción de Feulgen para detección de ADN, y otro, con verde metil de pironina (Brancroft & Stevens 1996).

#### **VII.3.1.2. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)**

El estudio de los FGIHI mediante MET se realizó en tejidos de berberechos de *Villabril*. Los tejidos de berberechos diagnosticados mediante histología como afectados por FGIHI en un grado de intensidad medio y elevado, se extrajeron de la solución fijadora de Carson y se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en tampón PIPES (Sigma) 0,1 M (pH 7,2) durante 2 horas a 4 °C. A continuación se sometieron a un lavado en tampón PIPES y fueron postfijados mediante tetróxido de osmio al 1 % en PIPES durante 2 horas a 4 °C. Tras un proceso de deshidratación en una serie de alcoholes de graduación creciente (50° - 100°), fueron incluidos en resina de epon. Finalmente se realizaron cortes ultrafinos (70-90 nm) de los bloques resultantes, que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 operando a 80 kV.

### **VII.3.2. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI**

#### **VII.3.2.1. Dinámica temporal**

Entre noviembre 1999 y noviembre de 2000 se llevó a cabo un seguimiento temporal de la prevalencia e intensidad de FGIHI en la población natural de berberecho ubicada en el banco de *Carril*, en la Ría de Arousa (Figura VII.1). Este banco se caracterizaba por tener producciones de berberecho muy importantes y al mismo tiempo presentar prevalencias elevadas de FGIHI (informes internos Xunta de Galicia). El diseño inicial del estudio epizootiológico contemplaba un período de seguimiento de un mínimo de 3 años. Sin embargo, como ya se expuso con anterioridad a lo largo de diferentes secciones de esta memoria, la severidad del invierno del año 2000,

caracterizado por elevadas precipitaciones que originaron descensos de la salinidad hasta valores en torno al 4 ‰, causó mortalidades masivas de moluscos bivalvos en éste y otros bancos de berberecho, e impidió la continuidad de las labores de muestreo en los mismos. Con el fin de completar la información derivada de este estudio, entre octubre de 2001 y diciembre de 2002 se efectuó otro estudio de seguimiento de la dinámica temporal de desarrollo de FGIHI en el banco de *Sarrido* (Figura VII.1). Este banco se caracterizaba por ser también uno de los más productivos de la Ría de Arousa y por haber sido diagnosticada esta alteración en el trabajo de cartografía expuesto en el capítulo III y en informes patológicos posteriores realizados en el CIMA.

En ambos bancos se recogieron con periodicidad mensual lotes de 25 berberechos adultos de talla comercial ( $L > 28$  mm) o lo más próxima a ella. Se dio el hecho de que en determinados meses no fue posible encontrar berberechos que superasen los 28 mm, definidos por la legislación como legalmente comercializables; en estos casos se recolectaron los berberechos de mayor talla disponible, que en todo caso siempre superaron los 20 mm de longitud anteroposterior. En *Carril* a lo largo de todo el estudio se recolectaron un total de 275 berberechos de talla media  $23,3 \pm 2,7$  mm (media  $\pm$  DE); en *Sarrido* el número total de berberechos estudiados fue de 375, con una longitud anteroposterior media de  $28,0 \pm 2,3$  mm. Debido al carácter submareal de la población de *Carril* las muestras fueron recolectadas desde embarcación empleando un *raño* o *gancha*. En el caso de *Sarrido* la población muestreada se ubicaba en la zona límite entre el intermareal y submareal, por lo que se empleó igualmente un *raño* pero manipulado a pie.

Estas muestras se procesaron mediante técnicas histológicas clásicas (apartado III.3) y fueron examinadas al microscopio óptico, caracterizando el grado de intensidad de desarrollo de FGIHI en cuatro niveles mediante la siguiente escala desarrollada en base a la extensión de las lesiones y los tejidos y órganos afectados:

- 0: libre de la alteración.
- 1: granulocitomas de pequeña extensión muy localizados en el tejido conjuntivo del borde del manto.
- 2: granulocitomas de mayor extensión que afectan a áreas mayores (borde del manto, zona gonadal y branquias).
- 3: extensión masiva de los focos de infiltración hemocitaria, que están presentes en casi todos los órganos representados.



Con carácter mensual, y para cada una de las poblaciones estudiadas, se calculó la prevalencia de FGIHI (como el porcentaje de individuos muestreados afectados por la enfermedad) y la intensidad media poblacional de FGIHI. Esta última es un índice ponderado, que refleja el porcentaje de individuos presente en cada una de las categorías de intensidad de desarrollo de FGIHI consideradas (0, 1, 2, 3), y que responde a la siguiente expresión:

$$\text{Intensidad media poblacional} = [(n_1 \times 1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3)] / N$$

Donde:

$n_i$  = número de casos clasificados como (i)

(i) = categorías de intensidad de FGIHI

N = número total de berberechos examinados en la muestra

El índice varía entre 0 y 3, donde 0 indica que todos los individuos analizados están libres de la patología; y 3, que todas los berberechos están afectados por FGIHI en su mayor grado de intensidad.

#### **VII.3.2.2. Correlación con variables ambientales**

Se estudió la posible existencia de correlación entre el desarrollo de FGIHI y determinadas variables ambientales registradas a lo largo del período estudiado. Se emplearon los valores de temperatura, salinidad y concentración de clorofila *a* en la capa superficial (primeros 1,5 m de la columna de agua), procedentes de las estaciones de la red de control de condiciones oceanográficas del *INTECMAR* más próximas a los bancos de berberecho estudiados (A3, para *Carril*; A7, en el caso de *Sarrido*). Por problemas de calibración de las sondas del CTD no se dispuso de registros de salinidad y temperatura en la estación A3 correspondientes al período noviembre de 1999 a febrero de 2000. Asimismo tampoco se dispuso de los valores de concentración de clorofila *a* correspondientes a la estación A7. Se dispuso también, en el caso de *Carril*, de la temperatura media del aire y la precipitación mensual acumulada, registradas en la estación meteorológica de Vilagarcía del *INM*. Para todas estas variables se computó el promedio mensual, y se calcularon coeficientes de correlación por rangos de Spearman entre dichos valores y los de prevalencia e intensidad media poblacional mensual de FGIHI en ambos bancos. En *Sarrido*, complementariamente se registró, cada día de

recolección de las muestras de berberecho, la temperatura y salinidad mediante una sonda portátil. Estos registros también se emplearon para el cálculo de coeficientes de correlación con las mismas variables de progresión de la enfermedad.

### **VII.3.2.3. Relación con la edad**

Normalmente los bancos marisqueros de berberecho gallegos basan su explotación en la clase de edad anual correspondiente al reclutamiento/s del año anterior. En *Carril y Sarrido* esto se confirma (hasta el punto de que, como se comentó en el apartado VII.3.2.1, no fue posible encontrar berberechos de talla comercial durante todos los meses de estudio) y a lo largo del año solamente existe una única clase de edad en el banco hasta el período en que tienen lugar los episodios de reclutamiento de berberechos juveniles correspondiente al año en curso. Ambas clases conviven durante un tiempo y a continuación la clase adulta prácticamente desaparece debido a la explotación marisquera. Con el fin de estudiar la relación existente entre la susceptibilidad a la enfermedad de los FGIHI y la edad de los berberechos, se recolectaron en *Sarrido* berberechos comerciales adultos ( $L > 28$  mm: 1 año de edad) y juveniles (rango talla: 9 - 19 mm; edad menor de un año) en aquellos momentos a lo largo del período de estudio en los que se dio la coexistencia de ambas clases de edad (octubre de 2001, y octubre, noviembre y diciembre de 2002). Estos individuos se procesaron según técnicas histológicas clásicas ya descritas y, mediante su observación al microscopio óptico, se diagnosticó si sufrían la enfermedad. En base a dicho diagnóstico se calculó la prevalencia de FGIHI para cada grupo de edad y período de muestreo.

Para analizar la existencia de asociación entre la edad y el desarrollo de la alteración se realizó un test de Friedman en el que la variable analizada fue la prevalencia de FGIHI, los tratamientos fueron las clases de edad (juveniles y adultos) y los bloques los constituyeron los diferentes períodos de muestreo. Para la realización de los análisis se empleó la aplicación informática de estadística MINITAB 14.0, eliminándose aquellos berberechos que presentaban intensidades importantes de otras patologías. En alguno de los meses estudiados, tras eliminar aquellos berberechos afectados por otras patologías, el número de berberechos analizado era muy bajo. Por ello, con intención de verificar el resultado del test de Friedman se procedió a analizar el efecto de la clase de edad de una manera global mediante una tabla de contingencia en la que las filas las constituyeron las clases de edad (juveniles, adultos) y las columnas la

condición de sano o afectado por FGIHI. Esta tabla se analizó mediante el estadístico Chi-cuadrado.

### VII.3.3. EFECTOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI EN LA CONDICIÓN

Para evaluar el efecto de la enfermedad de los FGIHI sobre la condición de *Cerastoderma edule*, se recolectaron en Sarrido 150 berberechos adultos ( $26,3 \pm 2,1$  mm; media  $\pm$  DE) en octubre de 2002. Se registró el peso vivo total y el peso húmedo de la vianda de cada individuo. A continuación se extrajo una pieza de tejidos de unos 5 mm de espesor que fue procesada mediante las técnicas histológicas convencionales ya descritas, con el fin de diagnosticar la intensidad de FGIHI conforme a la escala descrita en el apartado VII.3.2.1. El resto de vianda de cada berberecho se pesó en fresco y después se sometió a un proceso de desecación en estufa (100 °C durante 24 h). Tras ello, se calculó para cada individuo la razón peso seco - peso húmedo, y dicho cociente se aplicó al peso húmedo total de la carne inicial para hallar su correspondencia en peso seco. La concha de cada individuo también se sometió a secado en las mismas condiciones que la carne (100 °C, 24 h) y se pesó a continuación. Se calcularon los dos índices de condición siguientes (Mann 1978; Lucas & Beninger 1985):

$$IC_{(i)} = \text{Peso seco carne} \times 100 / \text{Peso seco concha}$$

$$IC_{(ii)} = \text{Peso seco carne} \times 100 / (\text{Peso húmedo total} - \text{Peso seco concha})$$

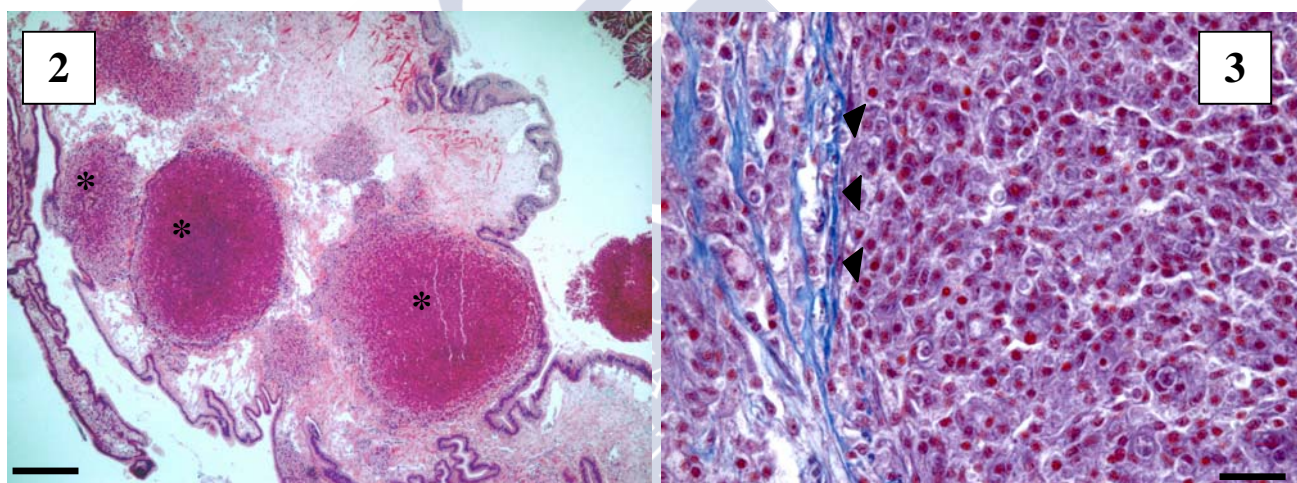
Los índices de condición de los individuos sanos y de los incluidos en distintas categorías de intensidad de FGIHI fueron comparados globalmente mediante tests no paramétricos de Kruskal-Wallis, y entre categorías de intensidad mediante la aplicación de tests no paramétricos de Mann-Whitney, ya que no cumplían los requisitos de la estadística paramétrica. Para que el cálculo de las pruebas estadísticas fuese posible las categorías de intensidad moderada e intensa fueron agrupadas en una única categoría (2 + 3). Los berberechos afectados por esporoquistes de trematodos y por neoplasia diseminada fueron eliminados de la comparación para evitar interferencias en el estudio.

## VII.4. RESULTADOS

### VII.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI

#### VII.4.1.1. Análisis de cortes histológicos

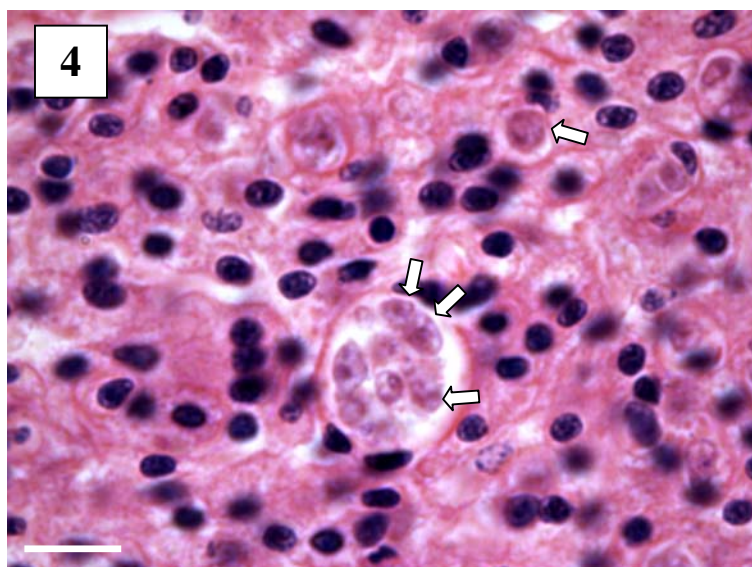
El examen de los cortes histológicos de berberechos afectados por FGIHI reveló que éstos consistían en numerosas masas de hemocitos, grandes y muy densas, presentes en diferentes tejidos y órganos: principalmente manto, gónada y pie, pero también glándula digestiva, branquia y riñón. En los casos de mayor intensidad estos focos inflamatorios originaban pérdida de la arquitectura normal de los tejidos y una extensa destrucción de tejidos y órganos (Figura VII.2). La tinción tricrómica de Mallory demostró que alguno de estos focos se encontraban limitados por fibras y células aplanadas, que probablemente eran fibroblastos (Figura VII.3).



**Figuras VII.2-3:** Cortes histológicos de tejidos de berberecho afectados por FGIHI. **2.** Borde del manto de berberecho afectado por la enfermedad de focos de infiltración hemocitaria intensa (\*). Tinción: hematoxilina de Harris y eosina. Barra: 200  $\mu$ m. **3.** Detalle de foco de infiltración hemocitaria intensa con fibras (puntas de flecha) en su periferia. Tinción: Tricrómica de Mallory. Barra: 20  $\mu$ m.

Algunos de los hemocitos integrantes de los focos contenían una o dos células no identificadas de morfología entre redondeada y alargada y de tamaño entre 2 y 5  $\mu$ m de longitud. En algunos casos se apreciaron hasta más de cuatro células en el interior de un único hemocito (Figura VII.4). La microscopía óptica no permitió una observación más detallada debido al pequeño tamaño de estas células. Exceptuando el núcleo de los hemocitos, los focos de infiltración no mostraron ninguna reacción positiva a la tinción

de Feulgen. Algunas de las células no identificadas y hemocitos presentaban pequeños depósitos rojos con la tinción de verde metil de pironina, sugiriendo una posible reacción ARN positiva. Con esta misma tinción, sólo se observaron depósitos azules ADN positivos en el núcleo de los hemocitos.



**Figura VII.4:** Corte histológico de un foco de infiltración hemocitaria intensa, en el que se aprecian células no identificadas (flechas) fagocitadas dentro de hemocitos. Hematoxilina de Harris y eosina. Barra: 10  $\mu$ m.

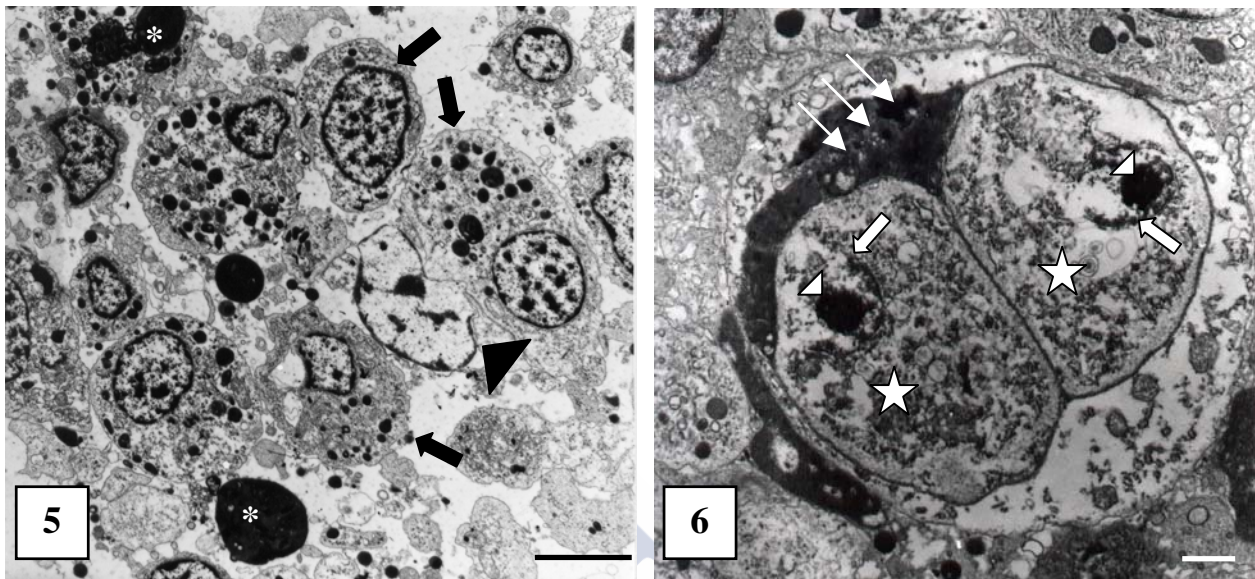
#### **VII.4.1.2. Estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)**

El examen ultraestructural de los FGIHI mostró que la mayoría de las células concentradas en los FGIHI tenían características propias de los granulocitos (Figura VII.5). Muchas células aparecían parcialmente degradadas y tenían núcleos picnóticos. Además, algunas células contenían una o dos células fagocitadas en el interior de una vacuola fagocítica. La mayoría de estas células fagocitadas poseían un núcleo parcialmente degradado en el que el nucleolo resultaba todavía distinguible. Su citoplasma contenía cisternas del retículo endoplasmático, abundantes vesículas con lamelas concéntricas, restos de mitocondrias y pequeños gránulos densos (Figura VII.6).

En el citoplasma de algunas células integrantes de los focos, así como en el interior de las células fagocitadas, se observaron grandes depósitos de material denso a los electrones (Figuras VII.5 y 6). El tamaño de estos depósitos fue variable (490-3480



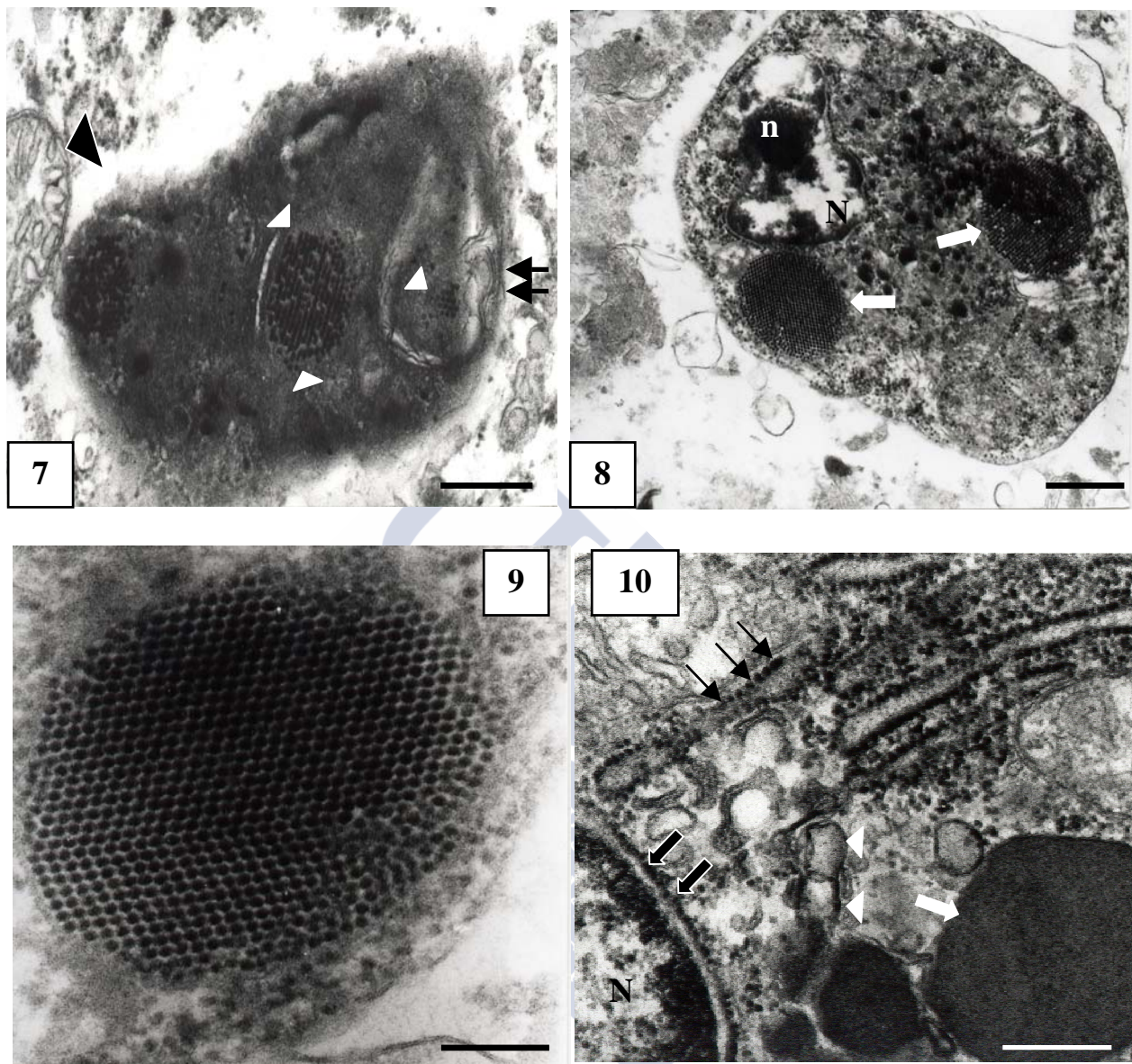
nm, n=15), y la forma fue redondeada en los depósitos pequeños y pleomórfica en los grandes.



**Figuras VII.5 y 6:** Microfotografías de MET realizadas en un corte ultrafino de un FGIHI. **5.** Células del hospedador (flechas), núcleo picnótico (punta de flecha) y depósitos grandes densos a los electrones (\*). Barra: 3  $\mu$ m. **6.** Dos células fagocitadas degradadas (estrellas), con núcleos también degradados (flechas) y nucleolos todavía distinguibles (puntas de flecha), observadas en el interior de una célula del hospedador. Las células fagocitadas aparecen parcialmente rodeadas por un depósito grande denso a los electrones (flechas delgadas). Barra: 1  $\mu$ m.

Conectados a estos depósitos, o en su interior (Figura VII.7), se diferenciaron sistemas de membranas dispuestas concéntricamente. Algunos de los pequeños depósitos de material denso aparecían rodeados por una membrana. En el interior del citoplasma y dentro de los depósitos densos a los electrones se apreciaron partículas de tipo vírico dispuestas en estructura paracristalina (Figuras VII.7-9) y ocasionalmente formando una única fila. Las partículas de tipo vírico eran desnudas, con cápsides icosaédricas y medían entre 19 y 21 nm de longitud (n=10) (Figura VII.9). Estas partículas de tipo vírico también se observaron en depósitos densos a los electrones presentes en el interior de vacuolas fagocíticas y dentro de células fagocitadas (Figura VII.8). Las partículas de tipo vírico no fueron detectadas en el interior del núcleo. Se observaron con frecuencia partículas densas a los electrones (23-24 nm de longitud, n=10) tapizando membranas a lo largo del núcleo así como cisternas y vesículas del retículo endoplasmático (Figura VII.10).





**Figuras VII.7-10:** Partículas de tipo vírico detectadas en FGIHI. Imágenes de MET. **7.** Estructura paracristalina de partículas de tipo vírico (puntas de flecha blancas) en el interior de un depósito denso a los electrones. Membranas concéntricas (flechas) en el interior del depósito, y mitocondria (punta de flecha negra) en su proximidad. Barra: 250 nm. **8.** Partículas de tipo vírico dispuestas en estructura paracristalina (flechas blancas) en el interior de célula fagocitada. N: núcleo; n: nucleolo. Barra: 500 nm. **9.** Detalle de la figura 8 mostrando partículas de tipo vírico icosaédricas y desnudas, dispuestas en estructura paracristalina. Barra: 200 nm. **10.** Partículas de tipo vírico tapizando cisternas dilatadas del retículo endoplasmático (flechas pequeñas) y en la membrana nuclear (flechas negras con borde blanco). Se observan también pequeñas vesículas (puntas de flecha blancas) y un depósito denso a los electrones (flecha blanca). N: núcleo. Barra: 200 nm.

## VII.4.2. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI

### VII.4.2.1. Dinámica temporal

Las prevalencias y la intensidad media poblacional de FGIHI en *Carril* y *Sarrido* registradas en los dos períodos estudiados se muestran en las Tablas VII.1 y VII.2 y en las Figuras VII.14 y VII.15. La enfermedad de los FGIHI presentó niveles epizooticos en ambos bancos a lo largo de todo el año. La prevalencia media en *Carril*, correspondiente a 11 muestras mensuales, fue del 52 % con un rango de variación que osciló entre valores del 4 % y el 92 %. La prevalencia media en *Sarrido* fue del 50 %, con un rango de oscilación de 20 – 68 %, en 15 muestras mensuales de seguimiento. En cuanto a los valores medios de intensidad media poblacional de FGIHI, el valor medio global a lo largo del período estudiado en *Carril* fue de 0,9, con un rango de variación de 0,04 – 1,9 en *Misela* y de 1,0 en *Sarrido*, y con una oscilación que se situó entre 0,2 y 1,4.

En la Figura VII.14 se representa la evolución mensual de la prevalencia (VII.14.A) y de la intensidad media poblacional (Fig. VII.14.B) de FGIHI en *Carril* detallando la distribución de los individuos afectados dentro de cada categoría de intensidad. En la Figura VII.15 (A y B) se muestra lo mismo pero para el caso de *Sarrido*. En ambos bancos existe una correlación positiva significativa entre prevalencia e intensidad media poblacional de FGIHI (*Carril*:  $r_s=0,932$ ,  $P=0,000$ ; *Sarrido*:  $r_s=0,939$ ,  $P=0,000$ ), por lo que la dinámica de la enfermedad en ambos bancos puede analizarse indistintamente en base a la evolución mensual de ambos parámetros.

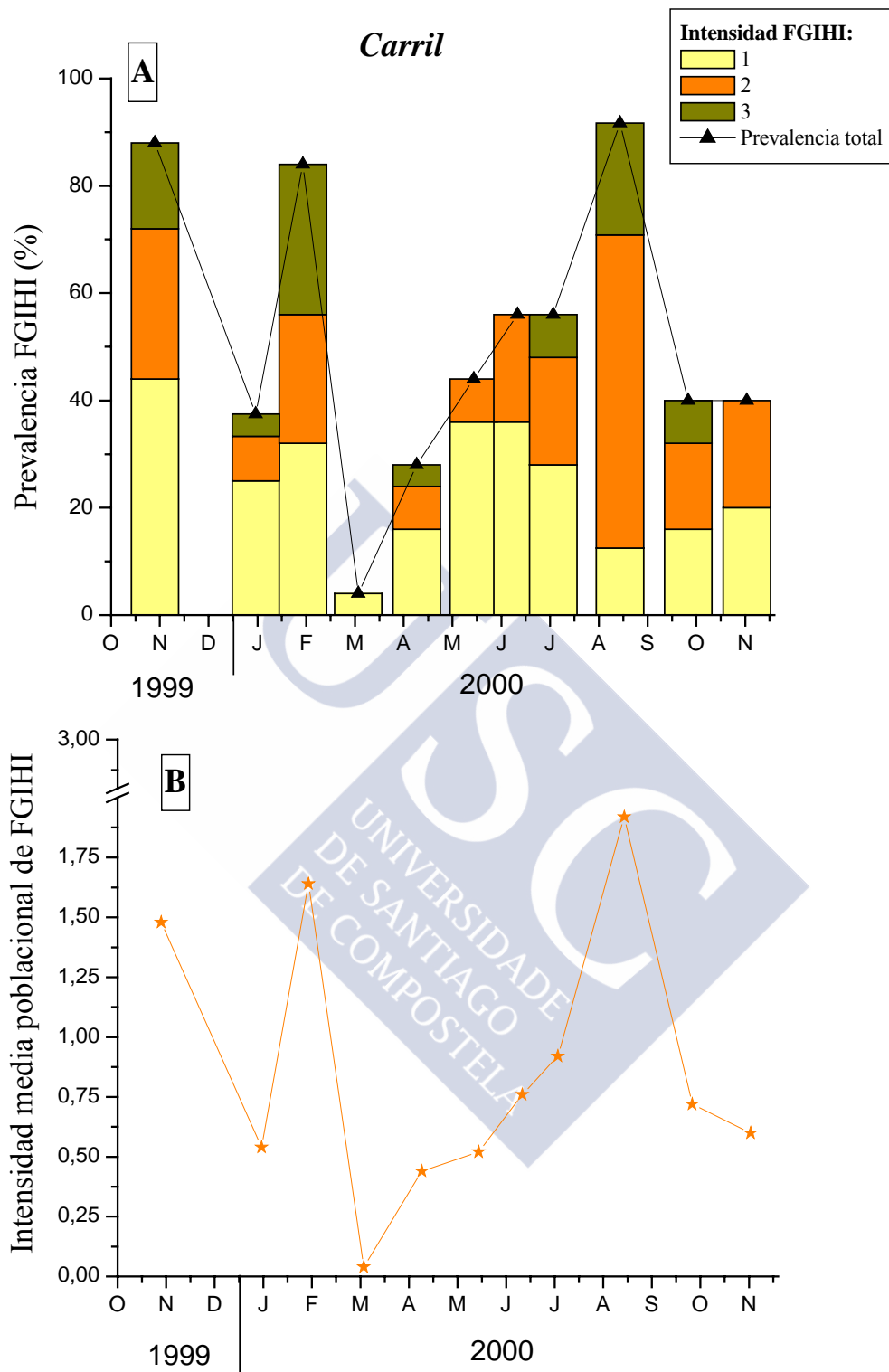
En base al análisis de la prevalencia y de la intensidad media poblacional de la enfermedad, no se ha observado ningún patrón estacional en el desarrollo de FGIHI en las dos poblaciones de berberecho estudiadas. El único elemento común en la dinámica de la enfermedad fue el valor mínimo de prevalencia detectado en marzo de 2000 en *Carril* y a finales de febrero de 2002 en *Sarrido*. En el caso de ambos mínimos de prevalencia la clase de mayor intensidad (3) desaparece por completo, mientras que en los meses precedentes a dicho mínimo esta clase de intensidad alcanzaba valores relativamente elevados.

**Tabla VII.1** : Prevalencia de FGIHI en berberechos de *Carril* (Ría de Arousa) en diferentes meses de los años 1999 y 2000

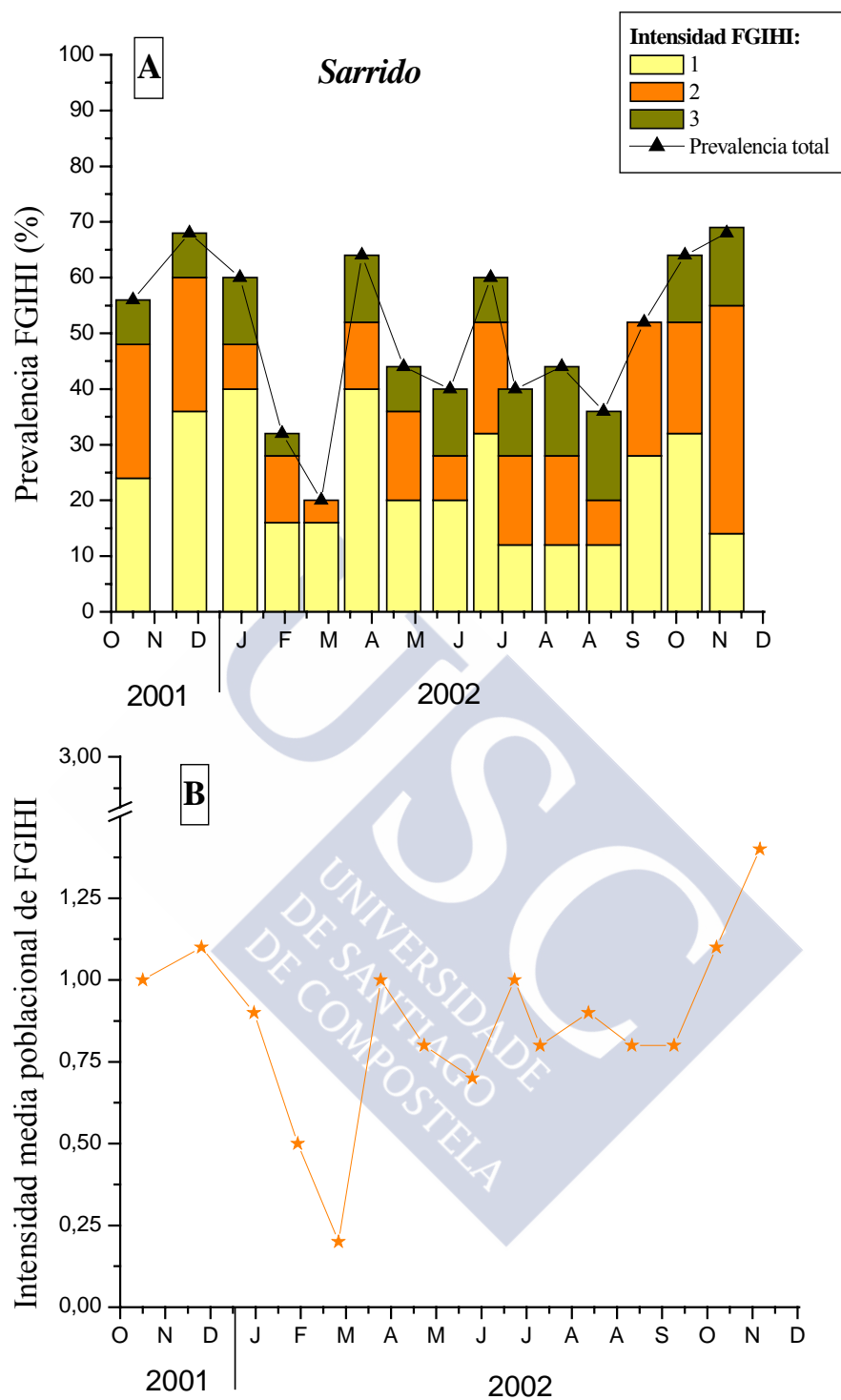
Fecha de muestreo	Nº berberechos analizados	Porcentaje de afectados por FGIHI	Porcentaje en cada nivel de severidad de FGIHI			Intensidad media poblacional
			1	2	3	
1999						
16 noviembre	25	88	44	28	16	1,5
2000						
17 enero	24	38	25	8	4	0,5
15 febrero	25	84	32	24	28	1,6
20 marzo	25	4	4	0	0	0,04
25 abril	25	28	16	8	4	0,4
30 mayo	25	44	36	8	0	0,5
26 junio	25	56	36	20	0	0,8
18 julio	25	56	28	20	8	0,9
28 agosto	24	92	13	58	21	1,9
9 octubre	25	40	16	16	8	0,7
14 noviembre	25	40	20	20	0	0,6
GLOBAL	273	52	25	19	8	0,9

**Tabla VII.2:** Prevalencia de FGIHI en berberechos de *Sarrido* (Ría de Arousa) en diferentes meses de los años 2001 y 2002

Fecha de muestreo	Nº berberechos analizados	Porcentaje de afectados por FGIHI	Porcentaje en cada nivel de severidad de FGIHI			Intensidad media poblacional
			1	2	3	
2001						
20 octubre	25	56	24	24	8	1,0
28 noviembre	25	68	36	24	8	1,1
2002						
2 enero	25	60	40	8	12	0,9
31 enero	25	32	16	12	4	0,5
27 febrero	25	20	16	4	0	0,2
27 marzo	25	64	40	12	12	1,0
25 abril	25	44	20	16	8	0,8
27 mayo	25	40	20	8	12	0,7
24 junio	25	60	32	20	8	1,0
11 julio	25	40	12	16	12	0,8
12 agosto	25	44	12	16	16	0,9
10 septiembre	25	36	12	8	16	0,8
8 octubre	25	52	28	24	0	0,8
5 noviembre	25	64	32	20	12	1,1
4 diciembre	22	68	14	41	14	1,4
GLOBAL	372	50	24	17	9	1,0



**Figura VII.14: Carril. A.** Distribución de la prevalencia de FGIHI con referencia a los diferentes niveles de intensidad de la alteración en cada uno de los períodos muestrados. **B.** Evolución de la intensidad media poblacional de FGIHI a lo largo del período de estudio.



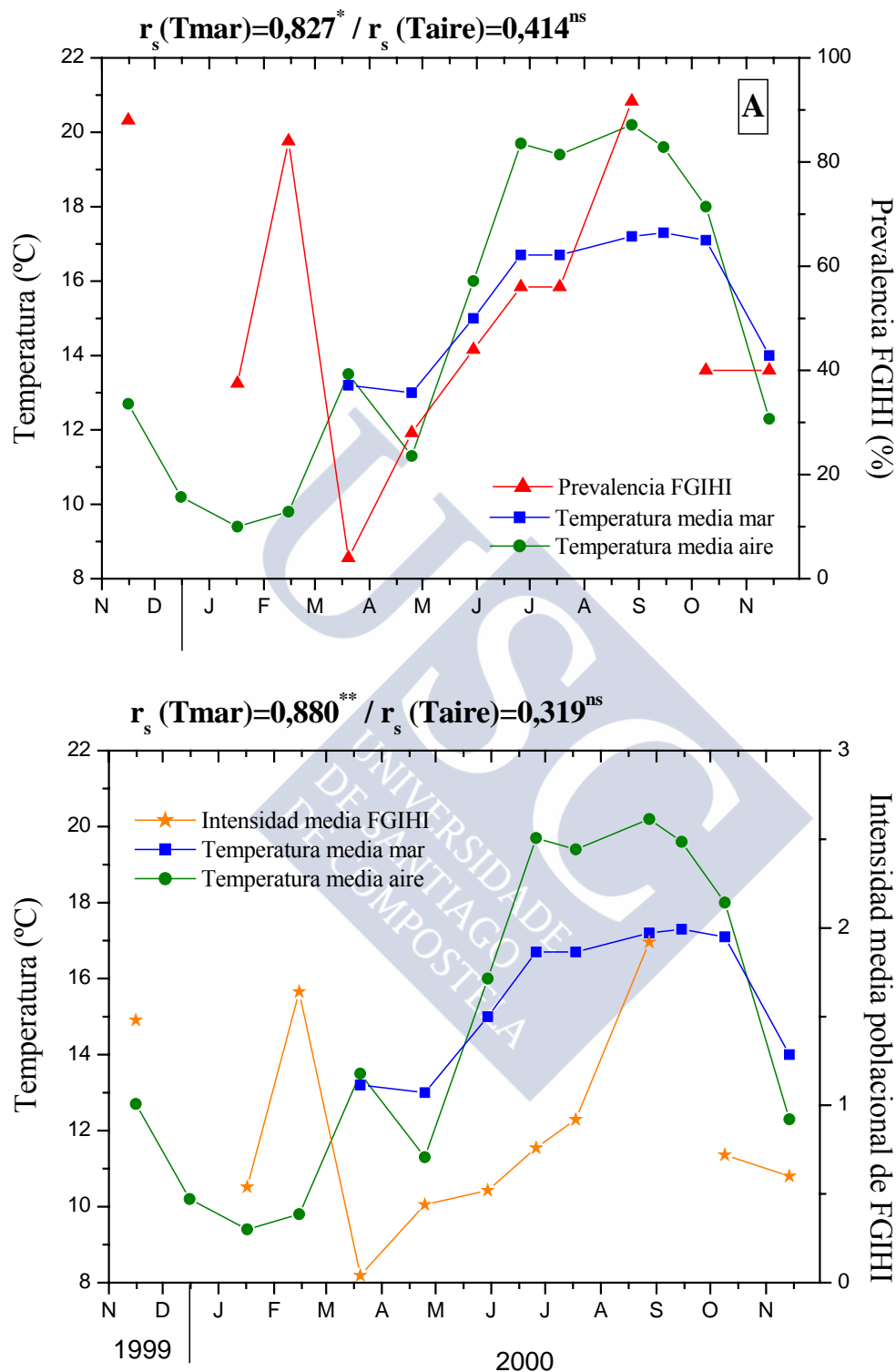
**Figura VII.15: Sarrido. A.** Distribución de la prevalencia de FGIHI con referencia a los diferentes niveles de intensidad de la alteración en cada uno de los períodos muestreados. **B.** Evolución de la intensidad media poblacional de FGIHI a lo largo del período de estudio.



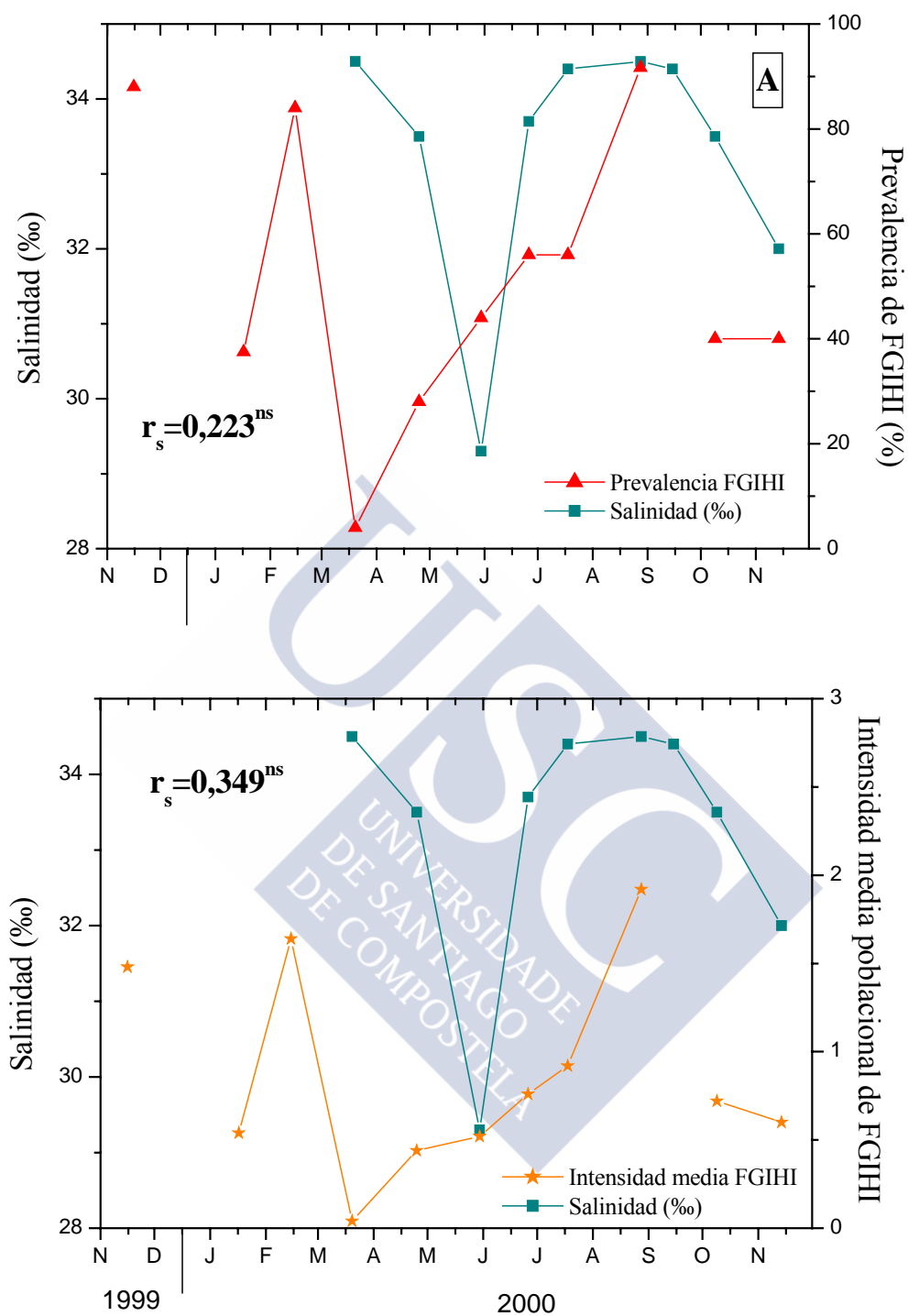
#### VII.4.2.2. Correlación con variables ambientales

Las Figuras VII.16 a 18 representan la variación mensual de prevalencia (A) y de intensidad media poblacional (B) de FGIHI en *Carril* frente a diferentes variables ambientales (temperatura del mar y del aire, salinidad y concentración de clorofila *a*) registradas en la zona. Los valores de temperatura atmosférica y del agua de mar en el período estudiado fueron totalmente normales y dentro de los márgenes previsibles del patrón climático atlántico que impera en la costa gallega. En el período en que se dispuso de registros de ambas variables, se detectó un patrón de variación similar entre la temperatura atmosférica y del agua de mar ( $r_s=0,958$ ,  $P=0,000$ ), si bien las temperaturas atmosféricas presentaron un margen mayor de variación (temperatura del aire media mínima: 9,4 °C en el mes de enero de 2000; temperatura media máxima: 20,2 °C en agosto de 2000) (Figura VII.16). La salinidad también mantuvo valores bastante estables (32,0 – 34,5 ‰), con la excepción del mes de mayo de 2000 en que se registró una bajada puntual de la salinidad hasta valores medios de 29,3 ‰, debido a las elevadas precipitaciones de abril de 2000 (Figura VII.17). Los valores de concentración de clorofila *a* oscilaron entre valores mínimos de 0,4 y máximos de 6,8 µg/L (Figura VII.18). No se observó correlación significativa alguna entre la progresión de FGIHI y las condiciones ambientales, salvo para el caso de la temperatura media del mar que, en el período de que se disponían datos (marzo-diciembre de 2002), mostró una correlación significativa con la prevalencia de FGIHI ( $r_s=0,827$ ,  $P=0,011$ ) y con la intensidad media poblacional ( $r_s=0,880$ ,  $P=0,004$ ).

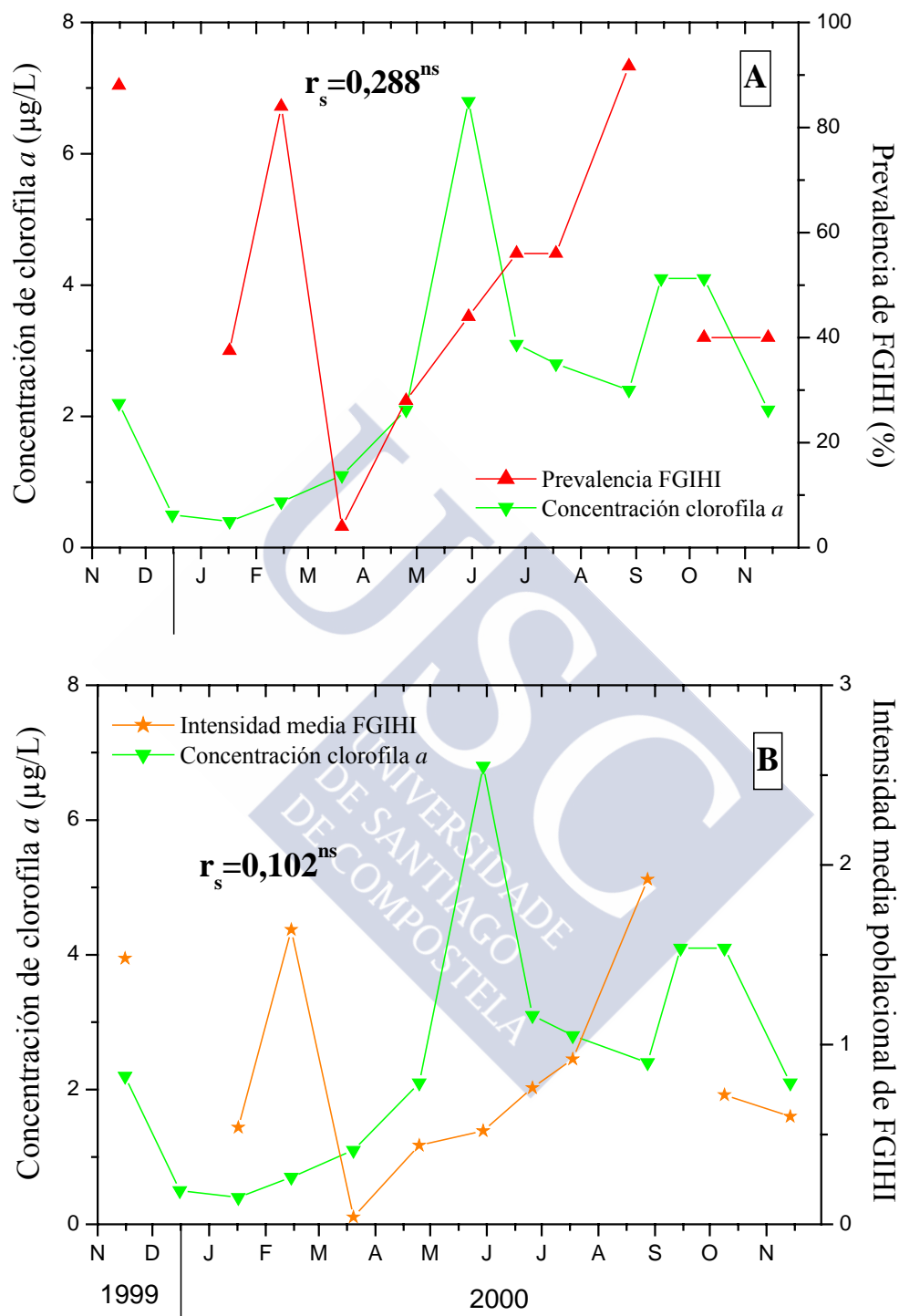
En las Figuras VII.19 y 20 se representan las mismas variables representativas de la evolución de la enfermedad en berberechos de *Sarrido* frente a los valores de temperatura y salinidad medias correspondientes a la estación oceanográfica A7 de la red del INTECMAR, y frente a los registros puntuales de temperatura y salinidad tomados en los días de muestreo mediante una sonda manual. En este caso no se observó correlación significativa alguna entre la progresión de FGIHI y las variables estudiadas.



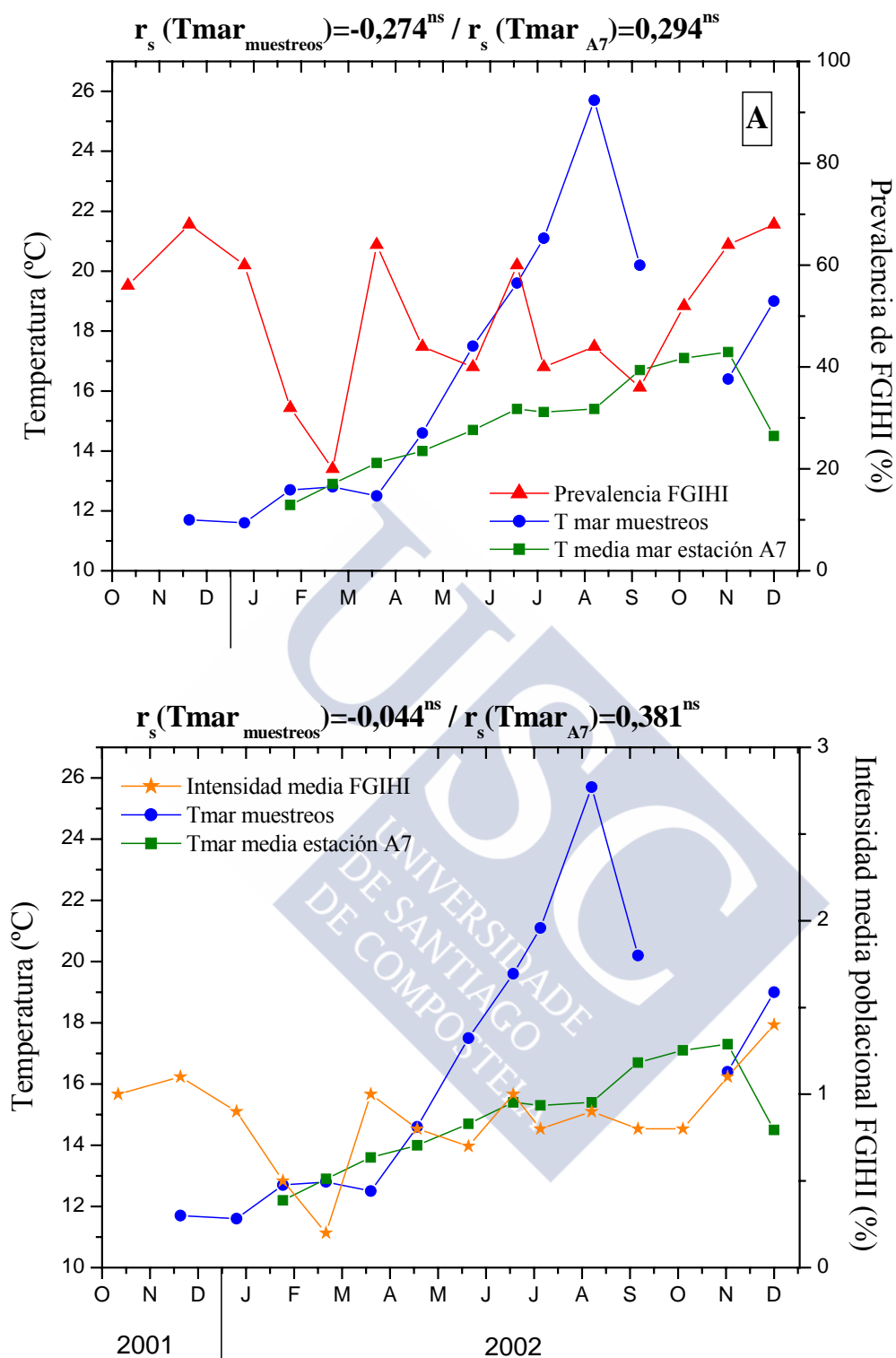
**Figura VII.16:** Variación mensual de la prevalencia (A) e intensidad media poblacional (B) de FGIHI en berberechos de *Carril* y de la temperatura media del mar y del aire durante el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



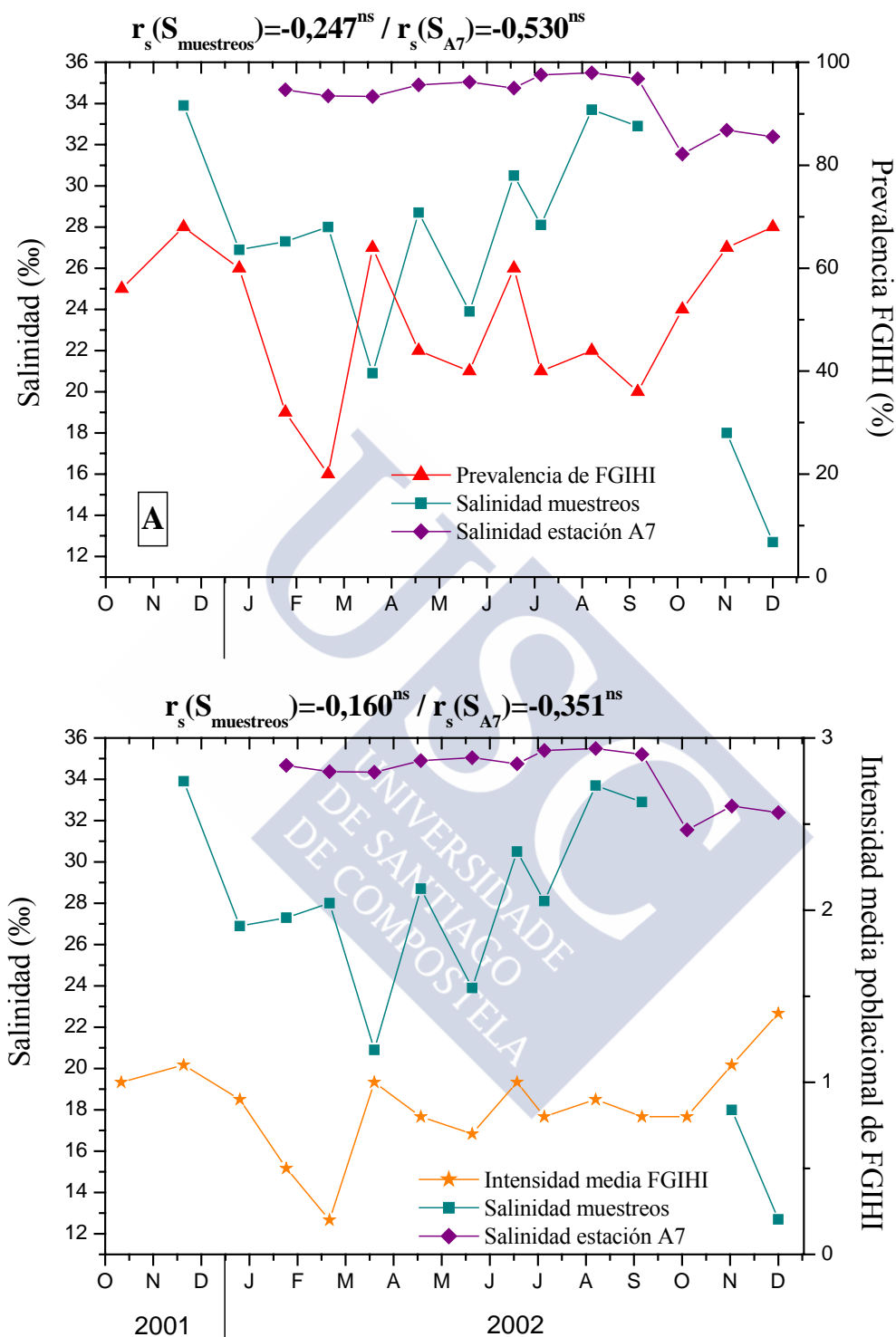
**Figura VII.17:** Variación mensual de la prevalencia (A) e intensidad media poblacional (B) de FGIHI en berberechos de *Carril* y de la salinidad media del mar durante el período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



**Figura VII.18:** Variación mensual de la prevalencia (A) e intensidad media poblacional (B) de FGIHI en berberechos de *Carril* y de la concentración de clorofila *a* correspondiente al período estudiado. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



**Figura VII.19:** Variación mensual de la prevalencia (A) e intensidad media poblacional (B) de FGIHI en berberechos de *Sarrido* y de la temperatura media del mar correspondiente a la estación A7 y de la temperatura puntual registrada durante los periodos de muestreo. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



**Figura VII.20:** Variación mensual de la prevalencia (A) e intensidad media poblacional (B) de FGIHI en berberechos de *Sarrido* y de la salinidad media del mar correspondiente a la estación A7 y de la temperatura puntual registrada durante los períodos de muestreo. Los valores de  $r_s$  se refieren a los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.



#### VII.4.2.3. Relación con la edad

La Tabla VII.3 muestra los valores de prevalencia de FGIHI de berberechos juveniles y adultos determinados en sucesivos muestreos realizados en *Sarrido*. Los resultados del test de Friedman realizado confirman la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de FGIHI entre ambos grupos de edad a lo largo del período estudiado, si bien muy cerca del límite de significación ( $S=4,00$ ;  $GL=1$ ;  $P=0,046$ ). El test de asociación, realizado a nivel global mediante una tabla de contingencia, verifica dicha diferencia ( $\chi^2=63,335$ ;  $GL=1$ ;  $P=0,000$ ), de manera que la prevalencia de FGIHI es claramente mayor entre los individuos pertenecientes a la clase comercial ( $L>28$  mm, más de un año de edad).

**Tabla VII.3:** Prevalencia de FGIHI detectados en berberechos de *Sarrido* pertenecientes a diferentes clase de edad

	Juveniles		Adultos	
Fecha de muestreo	Nº berberechos examinados*	Prevalencia (%)	Nº berberechos examinados*	Prevalencia (%)
20/10/2001	81	23	30	40
8/10/2002	25	0	15	53
5/11/2002	25	0	14	57
4/12/2002	25	0	12	75
<b>Global/Prevalencia media</b>	156	6	71	56

\* Se refiere al número de berberechos examinados empleados en el cómputo de la prevalencia, es decir, aquellos que no presentaban a su vez neoplasia o infestaciones por esporoquistes de trematodos.

### VII.4.3. EFECTOS DE LA ENFERMEDAD DE LOS FGIHI EN LA CONDICIÓN

En la Tabla VII.4 se muestran los valores medios de dos índices de condición correspondientes a berberechos recolectados en *Sarrido* en octubre de 2002 y que fueron clasificados conforme a la intensidad de FGIHI; tras eliminar aquellos individuos afectados por otras patologías se analizaron un total de 122 berberechos.

**Tabla VII.4:** Valores medios ( $\pm$  error estándar) de condición en berberechos de *Sarrido* correspondientes a diferentes categorías<sup>(1)</sup> de intensidad de FGIHI

Categorías de intensidad de FGIHI	Número de individuos examinado*	IC <sub>(i)</sub>	IC <sub>(ii)</sub>
<b>0</b>	105	8,45 $\pm$ 1,60	6,26 $\pm$ 1,34
<b>1</b>	7	6,65 $\pm$ 1,35	5,73 $\pm$ 1,07
<b>2+3<sup>(1)</sup></b>	10	5,68 $\pm$ 1,31	5,36 $\pm$ 1,65
<b>Total</b>	122		

\* Se refiere al número de berberechos examinados empleados en el análisis estadístico, es decir, aquellos que no presentaban a su vez neoplasia o infestaciones por esporoquistes de trematodos.

<sup>(1)</sup> Para que el cálculo de las pruebas estadísticas fuese posible se procedió a la acumulación de las categorías 2 y 3 de intensidad de FGIHI

Debido a que el número de berberechos afectados fue pequeño en alguna de las categorías de intensidad, fue necesario agrupar las categorías 2 y 3 para poder realizar el cálculo de los tests estadísticos. Los resultados de los mismos se exponen en la Tabla VII.5. Se confirman diferencias estadísticamente significativas en los valores de índice de condición entre los individuos sanos y los que presentan mayor intensidad de FGIHI, siendo significativamente menor la condición de los berberechos incluidos en esta última categoría (2+3).

**Tabla VII.5:** Resultados de pruebas estadísticas realizadas para analizar las diferencias en la condición entre clases de intensidad<sup>(1)</sup> de FGIHI. *n.s.*= $P>0,05$ ; no significativo;  $*=0,05>P>0,01$ ;  $**=0,01>P>0,001$ ;  $***=P<0,001$

Variable	CLASES DE INTENSIDAD DE FGIHI	Test empleado	N	Grados de libertad	Estadístico	P	
IC (i)	0 vs 1 vs 2+3	Kruskall-Wallis	122	2	H= 24,96	0,000	***
	0 vs 1	Mann-Whitney	112	-	W= 6163,5	0,006	**
	0 vs 2+3	"	115	-	W= 6526,0	0,000	***
	1vs 2+3	"	17	-	W= 77,0	0,188	n.s.
IC (ii)	0 vs 1 vs 2+3	Kruskall-Wallis	122	2	H= 7,09	0,029	*
	0 vs 1	Mann-Whitney	112	-	W= 5998,5	0,431	n.s.
	0 vs 2+3	"	115	-	W= 6350,0	0,010	**
	1vs 2+3	"	17	-	W= 76,0	0,223	n.s.

<sup>(1)</sup> Para que el cálculo de los tests estadísticos fuese posible se procedió a la acumulación de las categorías 2 y 3 de intensidad de FGIHI

## VII.5. DISCUSIÓN

La defensa interna de los moluscos bivalvos se basa en un sistema innato, no linfoidal, que incluye mecanismos celulares y componentes humorales (Kinne 1980; Montes *et al.* 1995; Roch 1999). El propósito de este sistema es neutralizar y eliminar los materiales extraños al organismo, incluyendo partículas inorgánicas, organismos vivos (patógenos o no) y células propias del organismo modificadas (Wootton *et al.* 2003). Cuando las células son dañadas o destruidas, se inicia una respuesta protectora en la mayor parte de metazoos denominada inflamación, que pretende destruir, diluir o aislar, los agentes deletéreos y las células muertas o dañadas. La finalización exitosa del proceso inflamatorio implica la sustitución de las células muertas o dañadas por células sanas, resultando en una completa renovación de la arquitectura tisular. Sin embargo, el proceso inflamatorio no siempre se completa con éxito, pudiendo estabilizarse en el aislamiento *in situ* del agente dañino y los restos celulares en alguna forma de encapsulación, o incluso provocar que el organismo muera a lo largo del proceso reparador (Sparks 1993). La alteración patológica caracterizada por la presencia de focos grandes de infiltración hemocitaria intensa (FGIHI) coincide con esta descripción de proceso inflamatorio inconcluso. En el presente estudio se ha profundizado en la caracterización de esta patología a nivel histológico y citológico, mediante tinciones específicas y microscopía electrónica de transmisión. Pese a que se apreció respuesta

defensiva por parte del hospedador (mediante granulocitomas y fibroblastos dispuestos alrededor de muchos de los focos) la patología parece progresar en los organismos afectados, causando pérdida de la arquitectura normal de los tejidos e incluso la destrucción total de los mismos. Se confirma, por tanto, la patogenicidad de esta patología referenciada en estudios previos (Villalba *et al.* 2001; Carballal *et al.* 2001).

En cuanto a la caracterización de las células fagocitadas, aún habiéndose realizado su estudio ultraestructural, éstas mostraron diferentes grados de degradación que hicieron imposible la determinación de si se trataba de células dañadas del hospedador o de un parásito protista fagocitado y destruido. Las células fagocitadas no presentaron características distinguibles que recordasen a alguno de los parásitos previamente descritos afectando a los berberechos gallegos (capítulo III). Por otra parte, el examen ultraestructural de los FGIHI reveló la presencia de partículas de tipo vírico, dispuestas en estructura paracristalina, en el citoplasma de algunas células fagocitadas y en depósitos densos a los electrones observados en células fagocitadas y en vacuolas fagocíticas. Estas partículas pueden corresponder a virus de tipo ARN, ya que los cortes histológicos de los FGIHI teñidos con verde metil de pironina mostraron depósitos rojos indicadores de reacción con ARN. Asimismo la fuerte tinción positiva con el citrato de plomo, empleado en el contraste de las rejillas de MET, es característica del ARN (Jones *et al.* 1996). Partículas de tipo vírico similares fueron descritas en mejillones de Dinamarca, dispuestas en estructura paracristalina dentro de inclusiones citoplasmáticas que contenían membranas y que inducían granulocitomas similares en el tejido conjuntivo del hospedador (Rasmussen 1986b). Estas partículas fueron caracterizadas como pertenecientes a la familia Picornaviridae. Las partículas víricas detectadas en berberechos gallegos pueden pertenecer también a esta familia. Su tamaño, morfología y el hecho de presentar agregaciones cristalinas coinciden con las características de esta familia de virus. Se observaron también partículas muy densas a los electrones tapizando las membranas del núcleo, y cisternas y vesículas del retículo endoplasmático de células integrantes de los FGIHI. Estas partículas fueron similares a partículas de tipo vírico descritas en vieiras *Pecten novaezelandiae*, mejillones *Perna canaliculus*, y almejas *Paphies ventricosum* de Nueva Zelanda (Jones *et al.* 1996; Hine & Wesney 1997). Los virus que infectan a moluscos adultos se han considerado con frecuencia como invasores secundarios o parásitos asociados a condiciones de estrés más que patógenos primarios; debido fundamentalmente a que normalmente se detectaban en organismos afectados por otra enfermedad o por condiciones de estrés ambiental (Lauckner 1983).

Sin embargo, iridovirus (Comps 1988), herpesvirus (Renault *et al.* 1994, Elston 1997) y birnavirus (Suzuki *et al.* 1998, Kurokawa *et al.* 1999) han sido relacionados como causantes de mortalidad en ausencia de infecciones primarias originadas por otros agentes. Además, pequeños virus de tipo ARN se han asociado con mortalidad de almeja fina *Tapes decussatus* de Galicia (Novoa & Figueras 2000) y de mejillón *Perna canaliculus* en Nueva Zelanda (Jones *et al.* 1996). Un problema habitual que surge de manera repetitiva en descripciones de presuntas enfermedades de origen viral en moluscos es la ausencia de demostración de una relación causal entre el virus y la patología observada. Esto implicaría que el agente fuese aislado y la enfermedad fuese reproducida experimentalmente cumpliendo los postulados de Rivers (Sindermann 1990). El hecho de la inexistencia de líneas celulares estables en moluscos condiciona seriamente el desarrollo de estudios virológicos en este grupo (Sindermann 1990; Elston 1997). En el presente trabajo las partículas víricas únicamente han sido descritas a nivel ultraestructural y no resulta posible concretar si la respuesta inflamatoria responde a dichas partículas víricas o si éstas constituyen una infección secundaria del hospedador debido a su posible debilitamiento. Puesto que el elevado nivel de degradación de las células fagocitadas presentes en los FGIHI ha sido una constante en todas las muestras estudiadas mediante MET, resulta necesario en un futuro abordar el estudio mediante técnicas de tipo molecular con el fin de profundizar en la caracterización de la etiología de esta alteración.

En cuanto a los aspectos epizootiológicos de los FGIHI, durante el período de estudio la patología alcanzó niveles epizooticos en ambos bancos a lo largo de todo el año, con una prevalencia media en torno al 50 % y una intensidad media poblacional de 1,0. La prevalencia y la intensidad media poblacional presentaron una correlación positiva altamente significativa, lo cual indica que prevalencias altas de FGIHI estuvieron asociadas con intensidades también elevadas de desarrollo de la enfermedad. No se observó estacionalidad en la evolución de los FGIHI en ninguna de las dos poblaciones de berberecho estudiadas. La única coincidencia en la dinámica de la enfermedad en ambas poblaciones fue el hecho de que niveles mínimos de prevalencia de FGIHI coincidieron con la práctica desaparición de la categoría de máxima intensidad de parasitación, mientras que en los meses precedentes un porcentaje elevado de los berberechos se encuadraban dentro de esta categoría. Es probable que la disminución súbita de la prevalencia se deba a la retirada de la población (por mortalidad) de los individuos más intensamente afectados por FGIHI (Kinne 1980). La

magnitud de la disminución de la prevalencia de estas clases de intensidad de parasitación elevada, constituye un método indirecto de valoración de la mortalidad debida al desarrollo de la enfermedad (Lester 1984). En base a esta técnica, las disminuciones bruscas de la prevalencia observadas en ambas poblaciones pueden indicar mortalidades comprendidas entre el 25 y el 80 % debidas al desarrollo de FGIHI, lo que reafirma el diagnóstico de elevada patogenicidad conferido a esta condición conforme al examen histológico de los tejidos.

La ausencia de estacionalidad en el patrón de desarrollo de los FGIHI concuerda con la ausencia de correlación entre la dinámica de la patología y las variables ambientales estudiadas. Cabe destacar que, si bien se detectó cierta correlación positiva significativa entre la progresión de la enfermedad y la temperatura del agua de mar en *Carril*, la ausencia de un registro continuo de esta variable a lo largo de todo el año, el hecho de que dicha correlación no existiese con la temperatura del aire (cuando temperatura del mar y del aire presentaron un patrón simétrico en el período del que se disponían datos de ambas variables), así como con ninguna de estas dos variables en *Sarrido*, pone en duda la robustez de dicha correlación.

En cuanto al desarrollo de FGIHI en relación a la edad del hospedador, la prevalencia de la enfermedad fue significativamente mayor en los individuos adultos de talla comercial (1-2 años de edad) con respecto a los berberechos juveniles correspondientes al reclutamiento del año en curso, no resultando habitual en *Sarrido* detectar FGIHI en berberechos menores de un año de edad. Esta tendencia coincide con la detectada en las otras dos importantes alteraciones que afectan a los berberechos gallegos (neoplasia y esporoquistes de *Labratrema minimus*), y parece ser un patrón general en muchos grupos parásitos que afectan a moluscos bivalvos (Lauckner 1983; Heasman *et al.* 1996).

Como se comentó ya en otros capítulos de la presente memoria, los índices de condición pueden ser empleados para evaluar disminuciones en la condición fisiológica de los bivalvos. En el presente estudio se confirma una disminución significativa de la condición en aquellos berberechos con niveles elevados de intensidad de FGIHI con respecto a los individuos sanos. Es probable que el daño estructural de los órganos producido por el desarrollo de la enfermedad origine una interrupción en el funcionamiento normal de los mismos y un perjuicio en los procesos metabólicos asociados. Dicho resultado reafirma la hipótesis de la elevada patogenicidad de los FGIHI.



**VIII. CICLO GONADAL DEL BERBERECHO**  
***Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA**

---





## VIII. CICLO GONADAL DEL BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA

### VIII.1. RESUMEN

Se ha estudiado el ciclo gonadal del berberecho *Cerastoderma edule* en cuatro bancos naturales de las Rías de Galicia (NO de España) empleando técnicas histológicas. El patrón común encontrado en tres bancos localizados en las *Rías Baixas* presentó el inicio de la gametogénesis en otoño y su progreso durante el invierno. La madurez gonadal se alcanzó en la transición invierno-primavera y la puesta tuvo lugar a principios de primavera, seguida de restauración gonadal que originó un nuevo episodio de madurez y una nueva puesta a finales de primavera - inicio de verano. A mediados de verano comenzó la reabsorción de la gónada y hacia el final del verano-inicio del otoño la gónada aparecía en reposo. Se observó un patrón diferente en un banco situado en las *Rías Altas*, donde la progresión de la gametogénesis se extendía hasta la primavera y la madurez gonadal no se alcanzaba hasta mediada la primavera. Como consecuencia la puesta de primavera temprana no tuvo lugar y sólo se observó un período de puesta, que se extendió desde mediados de primavera hasta el otoño. La estrategia reproductiva del berberecho asegura que el desarrollo larvario tenga lugar cuando existe una disponibilidad adecuada de alimento, medido como concentración de clorofila *a*, en el medio .

### SUMMARY

The gametogenic cycle of the cockle *Cerastoderma edule* was studied in four natural beds of the Rías of Galicia (NW Spain) using histological techniques. The common pattern found in the 3 beds located in the *Rías Baixas* (Southern Bays) involved initiation of gametogenesis in autumn and its progression through the winter. Ripe gonad was attained by the transition winter-spring and spawning occurred in early spring followed by gonad restoration. This led to ripeness and then a new spawning wave took place in the period late spring to early summer. Gonad resorption started in mid summer and resting stage occurred in late summer-autumn. A different pattern was found in a bed located in the *Rías Altas* (Northern Bays) involving that progression of gametogenesis entered the spring and the ripe stage was not attained until mid spring.

As a consequence, early spring spawning did not take place and only one spawning period occurred, beyond mid spring until mid autumn. The cockle reproductive strategy assures that larval development occurs when food, measured as chlorophyll *a* concentration in seawater, is available.

## VIII.2. INTRODUCCIÓN

Como ya se comentó anteriormente, el berberecho *Cerastoderma edule* es una de las especies de bivalvos explotados comercialmente más importante de Galicia, tanto en producción como en facturación en el mercado, implicando en su recolección a un gran número de trabajadores, lo que le confiere además importancia social. El conocimiento de los ciclos reproductivos de los bivalvos marinos es esencial para desarrollar estrategias de gestión enfocadas a la sostenibilidad de las pesquerías. El ciclo gametogénico de *Cerastoderma edule* ha sido descrito previamente en otros países (Boyden 1971; Gimazane 1972; Gimazane & Lubet 1972 a, b; Kingston 1974; Seed & Brown 1975; Guillou *et al.* 1990). Asimismo ya se habían realizado con anterioridad algunos estudios sobre reproducción de poblaciones de berberechos de bancos gallegos, pero sin demasiada precisión, empleando métodos indirectos de determinación del estado gonadal –como escalas empíricas basadas en el aspecto externo de la masa visceral, variación de los índices de condición o frotis de tejido gonadal (González & Pérez Camacho 1984a; Mejuto 1984a, b; Pérez Camacho & Román 1984)- o empleando técnicas histológicas pero con una escala que contemplaba muy pocos estados gonadales (López *et al.* 1987). Además la relación entre la reproducción de los berberechos gallegos y las condiciones ambientales no fue abordada en ninguno de ellos.

El desarrollo gonadal de las poblaciones de berberecho de Galicia no tiene necesariamente que seguir los patrones descritos en otros países, ya que han sido citadas diferencias en el ciclo gonadal entre berberechos de áreas geográficas distintas, entre poblaciones de lugares próximos (Boyden 1971; Guillou *et al.* 1990), y diferencias interanuales en poblaciones de una misma ubicación (Yankson 1986; Navarro *et al.* 1989).

El objetivo de este estudio fue definir, utilizando técnicas histológicas, el ciclo gonadal de individuos sanos correspondientes a poblaciones de berberecho de diferentes

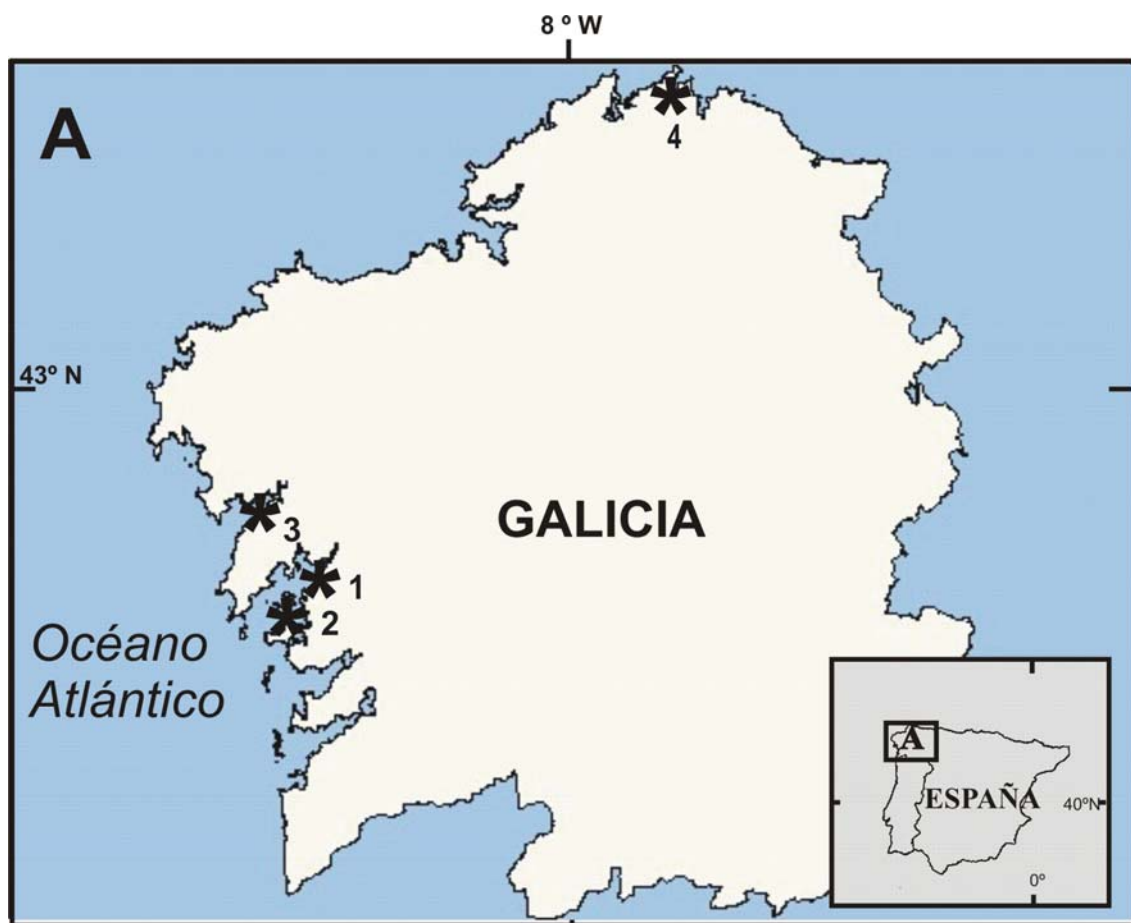
lugares de la costa gallega y evaluar su relación con algunos factores ambientales. De esta manera se sientan las bases para abordar el estudio del ciclo gametogénico de individuos afectados por diferentes parásitos y alteraciones patológicas, con el fin de valorar los efectos de las mismas en el potencial reproductor del berberecho (capítulo IX).

### VIII.3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### VIII.3.1. Estaciones de muestreo

En el presente estudio se consideraron cuatro bancos naturales (Fig. VIII.1), tres en las *Rías Baixas*: *Carril*, *Camaxe*, *Misela*; y otro en las *Rías Altas*: *Villabril*. El banco de *Carril* (N 42° 37', W 8° 46') está compuesto por una población submareal de berberecho *Cerastoderma edule* ubicada en la desembocadura del Río Ulla, en la zona interna de la Ría de Arousa. Un total de 275 berberechos ( $25,6 \pm 2,1$  mm, longitud media  $\pm$  DE) fueron recogidos entre noviembre de 1999 y noviembre de 2000. El banco de *Camaxe* (N 42° 32', W 8° 51') se encuentra en el rango intermareal de la playa del mismo nombre situada en la Illa de Arousa. En él se recogieron 325 individuos ( $24,8 \pm 3,5$  mm) entre octubre de 1999 y septiembre de 2000. La población natural de *Misela* (N 42° 47', W 8° 55') se ubica en una llanura intermareal situada en la zona interna de la Ría de Noia, estando afectada por los aportes fluviales del Río Tambre. Este banco sostiene la mayor pesquería de berberecho de Galicia. Un total de 525 berberechos ( $28,6 \pm 4,1$  mm) fueron recolectados en este lugar desde abril de 1999 a noviembre de 2000.

Desafortunadamente, el invierno 2000-2001 fue muy duro desde el punto de vista meteorológico, produciéndose lluvias muy intensas durante varios meses consecutivos que originaron importantes avenidas fluviales. En los tres bancos previamente descritos tuvo lugar una mortalidad masiva de moluscos que llevó prácticamente al agotamiento de la producción de berberecho de ese año. Esto hizo imposible continuar con los muestreos en ellos y, por tanto, se eligió una nueva población natural de berberecho para incrementar el período de estudio. Ésta fue la correspondiente al banco de *Villabril* (N 43° 43', W 7° 41') emplazado en una llanura intermareal en el interior de la Ría do Barqueiro. Aquí se recogieron un total de 322 individuos ( $30,1 \pm 2,7$  mm) entre marzo de 2001 y abril de 2002.



**Figura VIII.1:** Ubicación de los distintos bancos de berberecho estudiados:

1. Carril; 2. Camaxe; 3. Misela; 4. Villabril.

### VIII.3.2. Evaluación de la condición gonadal

Se recolectaron muestras al azar de 25 berberechos con periodicidad mensual en los bancos descritos. Se transportaron al laboratorio y se mantuvieron durante 24 h en tanques con agua de mar filtrada en circuito cerrado, con aireación y sin alimento, con el fin de permitir que liberasen el sedimento contenido en el tracto digestivo antes de proceder a su procesamiento. De cada individuo se extrajo una pieza de tejido de aproximadamente 5 mm de espesor, que contenía masa visceral, pie, lóbulos del manto y branquia. Esta pieza de tejido se procesó mediante técnicas histológicas clásicas (sección III.3). Los cortes histológicos resultantes fueron examinados al microscopio óptico para determinar el sexo y la condición gonadal. Se realizó una prueba Chi-cuadrado de bondad de ajuste sobre el total de machos y hembras de cada banco estudiado para confirmar si la relación macho/hembra se ajustaba a 1.



La condición gonadal se estableció en base a una escala que comprendía 7 estadios (Fig. VIII.2 y VIII.3); desarrollada a partir de los esquemas propuestos por Kingston (1974) para *Cerastoderma edule* y *C. glaucum*; por Wolowicz (1987) para *Cardium* (= *Cerastoderma*) *glaucum* y *C. hauniense*; y por Shafee & Daoudi (1991) para la almeja fina *Tapes decussatus*:

Estadio 0: Gónada en reposo

El sexo es indeterminado. Prácticamente la totalidad de la gónada está ocupada por tejido conjuntivo, no distinguiéndose, o muy difícilmente las paredes de los folículos. Aún estando presentes, no es posible determinar el sexo de las gametogonias.

Estadio 1: Gametogénesis temprana/inicial

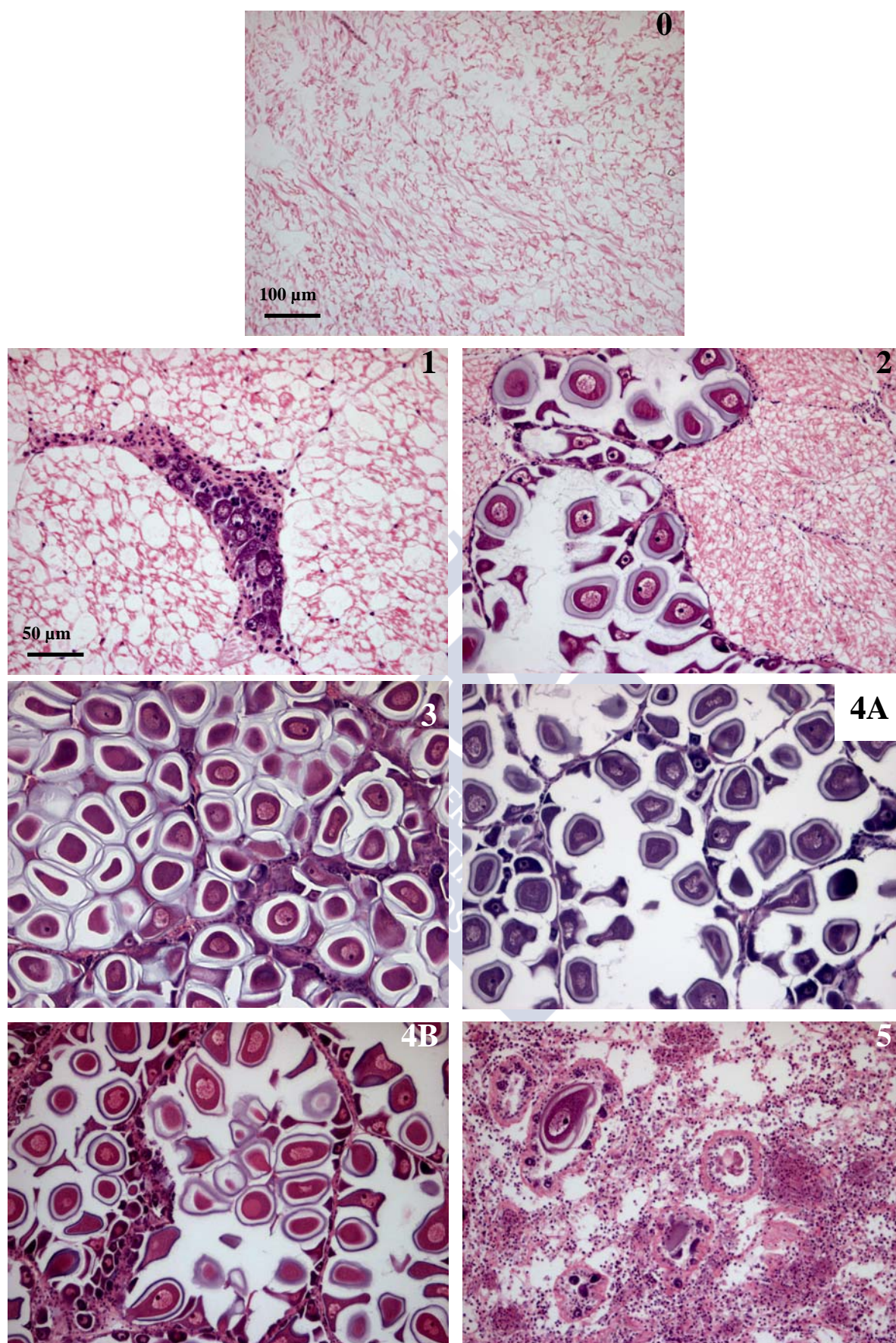
Se comienzan a detectar los primeros signos de gametogénesis. Las paredes de los folículos son evidentes y las células germinales tapizan la pared de los folículos.

Estadio 2: Gametogénesis en desarrollo

Los folículos ocupan una gran parte de la masa visceral mientras que el tejido conjuntivo está en regresión. Las hembras presentan ovocitos con forma de pera, que se encuentran en proceso de aumento de su tamaño, y que aparecen fijados a la pared del folículo por un tallo. Núcleo y nucleolo son muy evidentes y el citoplasma es granular. En machos las células dominantes en el interior de los folículos son espermatoцитos y espermátidas, aunque comienzan a aparecer algunos espermatozoides que ocupan el centro del folículo de manera desordenada.

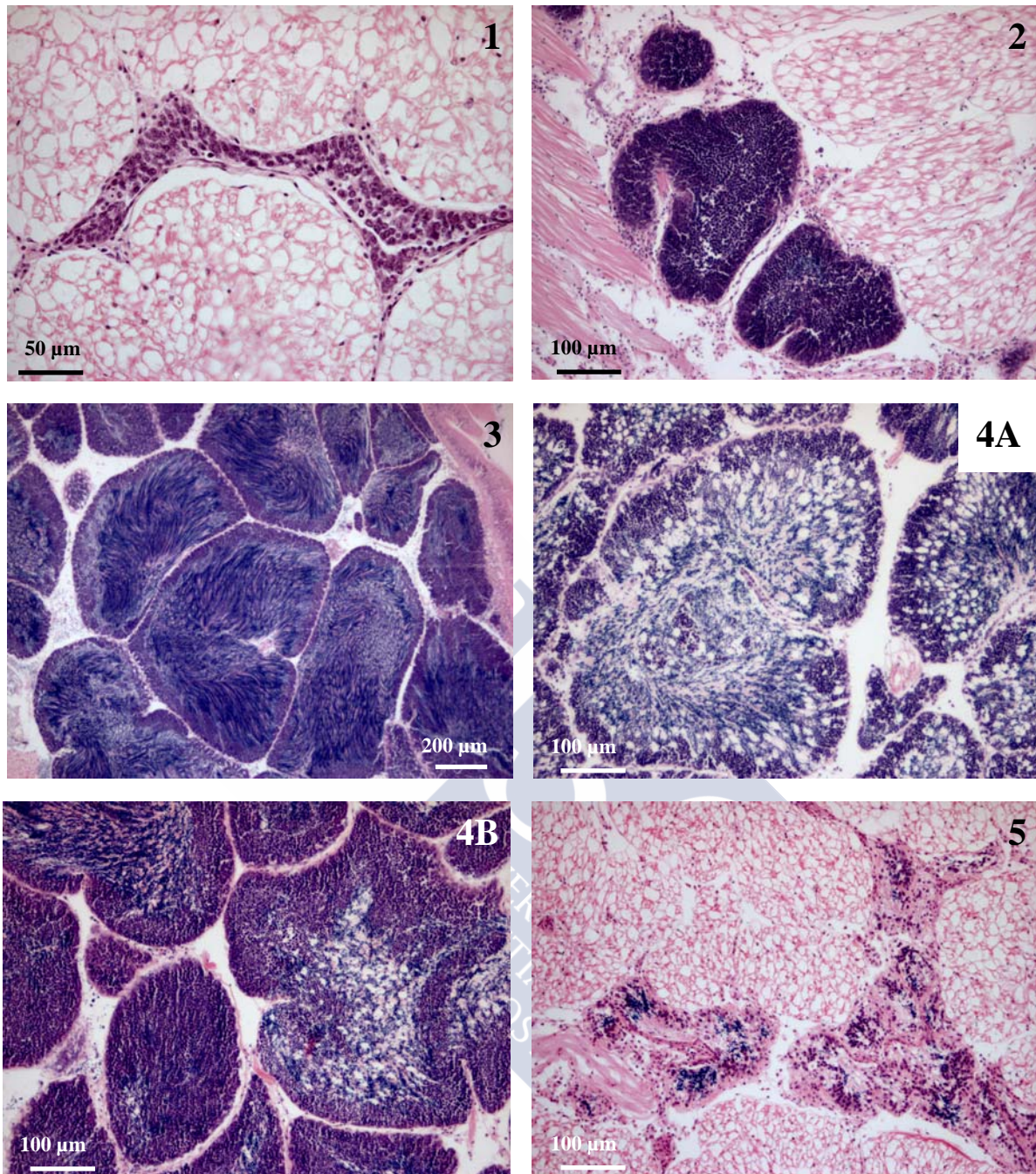
Estadio 3: Gónada madura

La gónada ocupa la mayor parte del volumen de la masa visceral, no distinguiéndose ya casi tejido conjuntivo separando los folículos que ahora presentan un aspecto muy distendido. Las hembras tienen los folículos completamente llenos de ovocitos libres que aparecen rodeados de una cubierta de albúmina. Los ovocitos tienen forma poligonal debido a que están muy comprimidos en el interior del lumen folicular. La gónada masculina está llena de espermatozoides organizados en forma de remolino con sus colas apuntando hacia el centro del lumen del folículo. Existen células que permanecen indiferenciadas en la periferia de los folículos.



**Figura VIII.2:** Imágenes de cortes histológicos correspondientes a los estadios de desarrollo gametogénico en hembras de berberecho. El estadio 0 es común para ambos sexos. La denominación de cada estadio figura en la esquina superior derecha. Barra en 0, válida también para 2, 3, 4A, 4B y 5.





**Figura VIII.3:** Imágenes de cortes histológicos correspondientes a los estadios de desarrollo gametogénico en machos de berberecho. La denominación de cada estadio figura en la esquina superior derecha.

Estadio 4A: Gónada en post-puesta

Ha tenido lugar una liberación parcial de los gametos y como consecuencia la presión en el interior de los folículos disminuye. En la gónada femenina, están presentes todavía algunos ovocitos maduros redondeados. En los machos, los espermatozoides han perdido su organización y los folículos están parcialmente vacíos.

#### Estadio 4B: Gónada en restauración

Un nuevo ciclo de desarrollo gametogénico tiene lugar en los folículos tras la puesta. Este estadio recuerda al estadio 2, pero los folículos están más dilatados y nuevas células indiferenciadas coexisten con gametos maduros.

#### Estadio 5: Reabsorción de la gónada

Los folículos degeneran, los hemocitos atacan a los gametos que no han sido liberados y comienza un proceso de citolisis de la gónada en el que los folículos son digeridos y sustituidos por tejido conjuntivo.

Los berberechos afectados por esporoquistes del trematodo *Labratrema minimus*, neoplasia diseminada o focos grandes de reacción hemocitaria intensa, fueron descartados del estudio. La influencia de dichas alteraciones en la reproducción son abordadas en el capítulo IX.

Se calculó un índice gonadal (IG) para cada muestra mensual (Seed & Brown 1975) como el valor medio de los berberechos integrantes de la misma y conforme a la siguiente categorización de los estadios de condición gonadal (Shafee & Daoudi 1991):

<u>Estadio 0</u>	(Gónada en reposo)	:0
<u>Estadio 1</u>	(Gametogenesis temprana/inicial)	:1
<u>Estadio 2</u>	(Gametogénesis en desarrollo)	:2
<u>Estadio 3</u>	(Gónada madura)	:3
<u>Estadio 4A</u>	(Gónada en post-puesta)	:2
<u>Estadio 4B</u>	(Gónada en restauración)	:2
<u>Estadio 5</u>	(Reabsorción de la gónada)	:1

#### **VIII.3.3. Parámetros ambientales**

Se estudió la relación entre la progresión de la gametogénesis en las distintas poblaciones y determinadas variables ambientales. Para ello, en todos los bancos se emplearon los registros semanales de temperatura y concentración de clorofila *a* en la capa superficial (primeros 1,5 m de la columna de agua), procedentes de las estaciones de la red de control de condiciones oceanográficas del INTECMAR más próximas a los bancos de berberecho estudiados (*M3* y *M7*, para el caso de *Misela*; *A5*, para Camaxe; *A3*, para *Carril* y la estación oceanográfica secundaria de *O Barqueiro* para *Villabril*).

Por problemas de calibración de las sondas del CTD no se dispuso de registros de salinidad y temperatura en la estación *M3* correspondientes a los meses de enero y febrero de 2000; ni del período octubre de 1999 a febrero de 2000, para el caso de las estaciones *A3* y *A5*. Asimismo en el caso de *O Barqueiro*, al tratarse de una estación secundaria, sólo se dispuso de datos de temperatura y salinidad. Se consideró también la temperatura media del aire registrada diariamente en las estaciones del *INM* de Noia (para el caso de *Misela*) y Vilagarcía (para los bancos de la Ría de Arousa). Para todas estas variables se computó el promedio correspondiente a los registros existentes entre fechas de muestreo.

## VIII.4. RESULTADOS

### VIII.4.1. Sexualidad y relación entre sexos (sex ratio)

La Tabla VIII.1. muestra el número de machos, hembras e individuos indeterminados que constituyen el total de berberechos que han sido muestreados en cada uno de los bancos estudiados. La prueba Chi-cuadrado realizada sobre el total de machos y hembras de cada población estudiada confirma una relación macho:hembra de 1:1. A lo largo del estudio no se ha observado ningún individuo hermafrodita.

**Tabla VIII.1.** Distribución de los berberechos de cada banco estudiado según su sexo.

Bancos estudiados	Nº de machos	Nº de hembras	Nº indeterminados	Nº excluidos <sup>1</sup>	Total muestreados	P (nivel de significación al 95%) <sup>2</sup>
Carril	69	92	28	86	275	0.07 (ns)
Camaxe	102	120	98	5	325	0.23 (ns)
Misela	210	215	29	71	525	0.81 (ns)
Villabril	135	115	3	69	322	0.21 (ns)

<sup>1</sup> Individuos excluidos debido a alteraciones patológicas.

<sup>2</sup> Probabilidad de que la  $H_0$  (machos y hembras siguen una distribución 1:1) sea verdadera. ns, diferencias no significativas:  $P > 0,05$



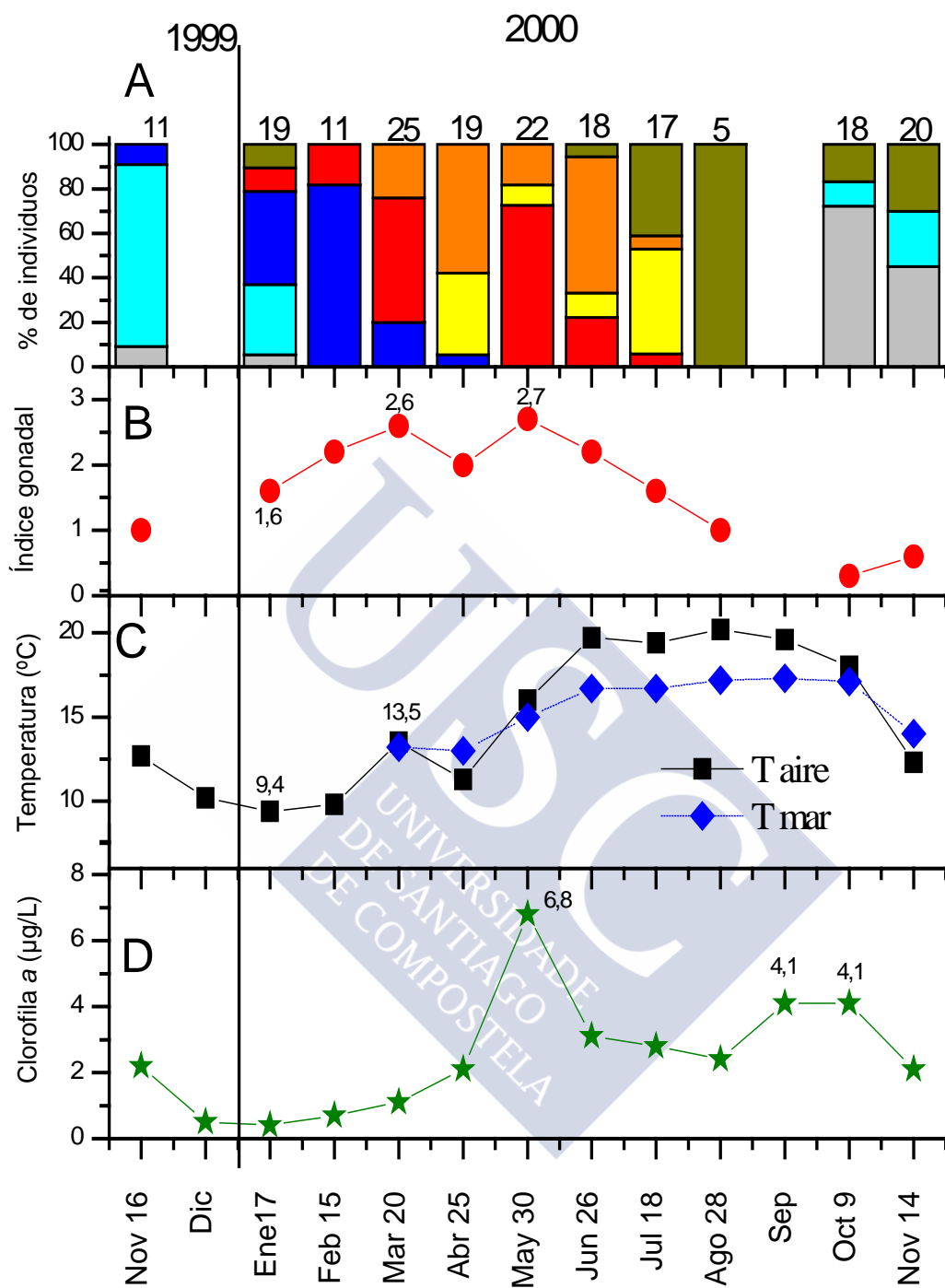
#### VIII.4.2.Ciclo gametogénico

El análisis de las preparaciones histológicas sugiere que el ciclo gametogénico de machos y hembras siguió un patrón temporal similar, salvo ligeras diferencias en el inicio de la gametogénesis, que parece detectarse antes en las hembras (aunque probablemente debido a que, en los estadios iniciales de desarrollo, son más fácilmente distinguibles las ovogonias que las espermatogonias). Por ello ambos sexos fueron considerados en conjunto en la descripción del ciclo gametogénico de los berberechos de cada uno de los bancos estudiados.

En *Carril* (Fig. VIII.4A), la gametogénesis comenzó en otoño y progresó a lo largo del invierno. Unos cuantos individuos aparecieron ya maduros en las muestras de enero y febrero. La madurez gonadal fue mayoritaria en la transición invierno-primavera. De esta forma el IG de la población ascendió en este período de un valor de 1,6 a 2,6. En la muestra de marzo, el 56% de los berberechos estaban maduros y el 24% estaban en un estadio 4B, lo cual significa que estos últimos estaban parcialmente desovados. La puesta general tuvo lugar a principios de la primavera, suponiendo un descenso en el índice gonadal, seguido de una restauración de la gónada. En la muestra correspondiente a mayo se observó un segundo período de madurez (IG de 2,7) seguido por un período de puesta y restauración de la gónada durante primavera tardía-principios de verano. El índice gonadal disminuyó a lo largo del verano. En la muestra de agosto, todos los berberechos que integraban la misma se encontraban en estadio de reabsorción gonadal y a principios de otoño la mayoría de la población de *C. edule* estaba en estadio de reposo. Un nuevo ciclo de gametogénesis comenzó en otoño de 2000.

**Figura VIII.4 (página siguiente): Carril. A.** Distribución mensual de los berberechos en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo gonadal. **B.** Variación del índice gonadal a lo largo del período de estudio. **C.** Variación mensual de la temperatura del agua de mar y del aire. **D.** Concentración media mensual de clorofila *a*.





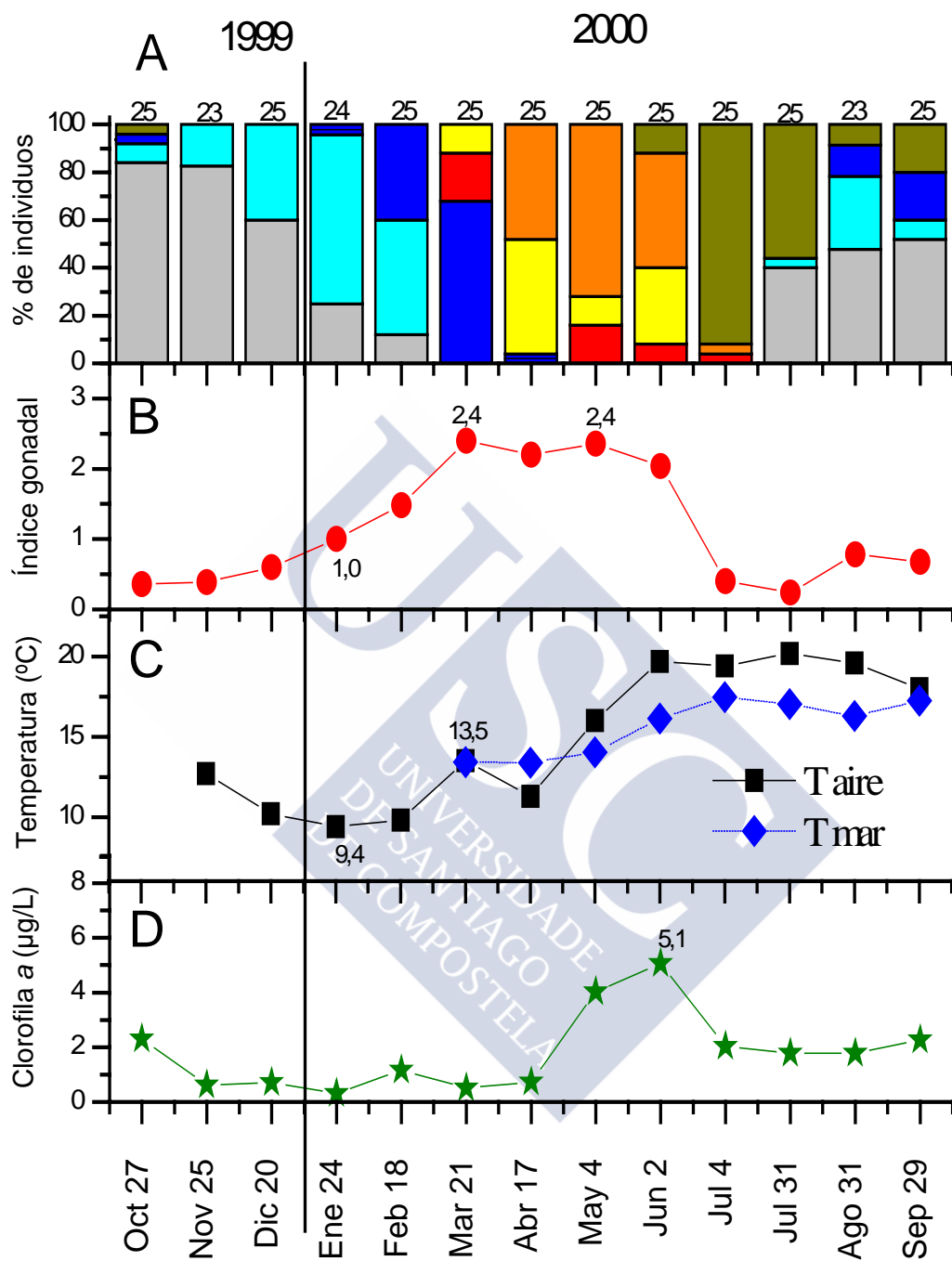
**Fig. VIII.4: Carril**

Estadios de desarrollo gonadal:

0 1 2 3 4A 4B 5

En *Camaxe* (Fig. VIII.5 A), el reposo gonadal fue la condición dominante a lo largo del otoño de 1999. La gametogénesis comenzó en otoño tardío y progresó a lo largo del invierno. Un bajo porcentaje de la población había alcanzado la madurez en la transición invierno-primavera. Se registró un incremento de 1,4 en el índice gonadal entre las muestras de enero y marzo (Fig. VIII.5B). El estadio de madurez seguido de una puesta parcial tuvo que ocurrir a principios de primavera, teniendo en cuenta que todos los individuos de la muestra del 17 de abril estaban en los estadios 4A ó 4B. La mayoría de los berberechos mostraban una condición de restauración gonadal, y unos pocos madurez gonadal, a mediados de primavera (muestra de mayo), lo que supuso un pico en el IG. Desde este momento, el porcentaje de berberechos cuya gónada se encontraba en post-puesta o reabsorción aumentó y en consecuencia el índice gonadal de la población disminuyó en la muestra de julio, momento en que el estadio de reabsorción gonadal fue dominante. A partir de aquí el porcentaje de berberechos con su gónada en estado de reposo aumentó a través del verano. A finales de agosto se reinició un nuevo período de gametogénesis.

**Figura VIII.5 (Página siguiente):** *Camaxe*. **A.** Distribución mensual de los berberechos en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo gonadal. **B.** Variación del índice gonadal a lo largo del período de estudio. **C.** Variación mensual de la temperatura del agua de mar y del aire. **D.** Concentración media mensual de clorofila *a*.



**Fig VIII.5: Canaxe.**

Estadios de desarrollo gonadal:



En *Misela* (Fig. VIII.6 A, B), el estudio de la condición gonadal comenzó en abril de 1999, momento en el que todos los berberechos estaban en estadio 4B, lo que significa que una puesta previa había tenido lugar. Desde ese momento hasta principios de verano (muestra del 13 de julio) los berberechos analizados estaban distribuidos mayoritariamente entre los estadios 3, 4A y 4B. A mediados de verano (10 de agosto) el porcentaje de berberechos con gonada en reabsorción había aumentado y el índice gonadal disminuido. El porcentaje de berberechos con gónada en reposo aumentó a finales de verano y un nuevo ciclo gametogénico comenzó a principios de otoño. En la muestra de febrero todos los berberechos estaban en estadio de gónada en desarrollo y en marzo el 61% de la población estaba en condición de madurez (IG de 2,6). Una puesta general tuvo lugar a principios de primavera ya que la mayoría de los berberechos mostraban restauración gonadal en la muestra de mayo de 2000. Un nuevo pico de índice gonadal fue registrado en junio de 2000, con los berberechos estando mayoritariamente distribuidos en los estadios 3 y 4B. Desde ese momento se incrementó el número de berberechos con la gónada en post-puesta y el índice gonadal disminuyó. A mediados de verano (muestra del 1 de agosto de 2000) la mayoría de los berberechos mostraron gónadas en post-puesta y en reabsorción. Esta última fue la condición dominante en las siguientes muestras, con una disminución en el IG, y un nuevo ciclo gametogénico comenzando a mediados de otoño de 2000.

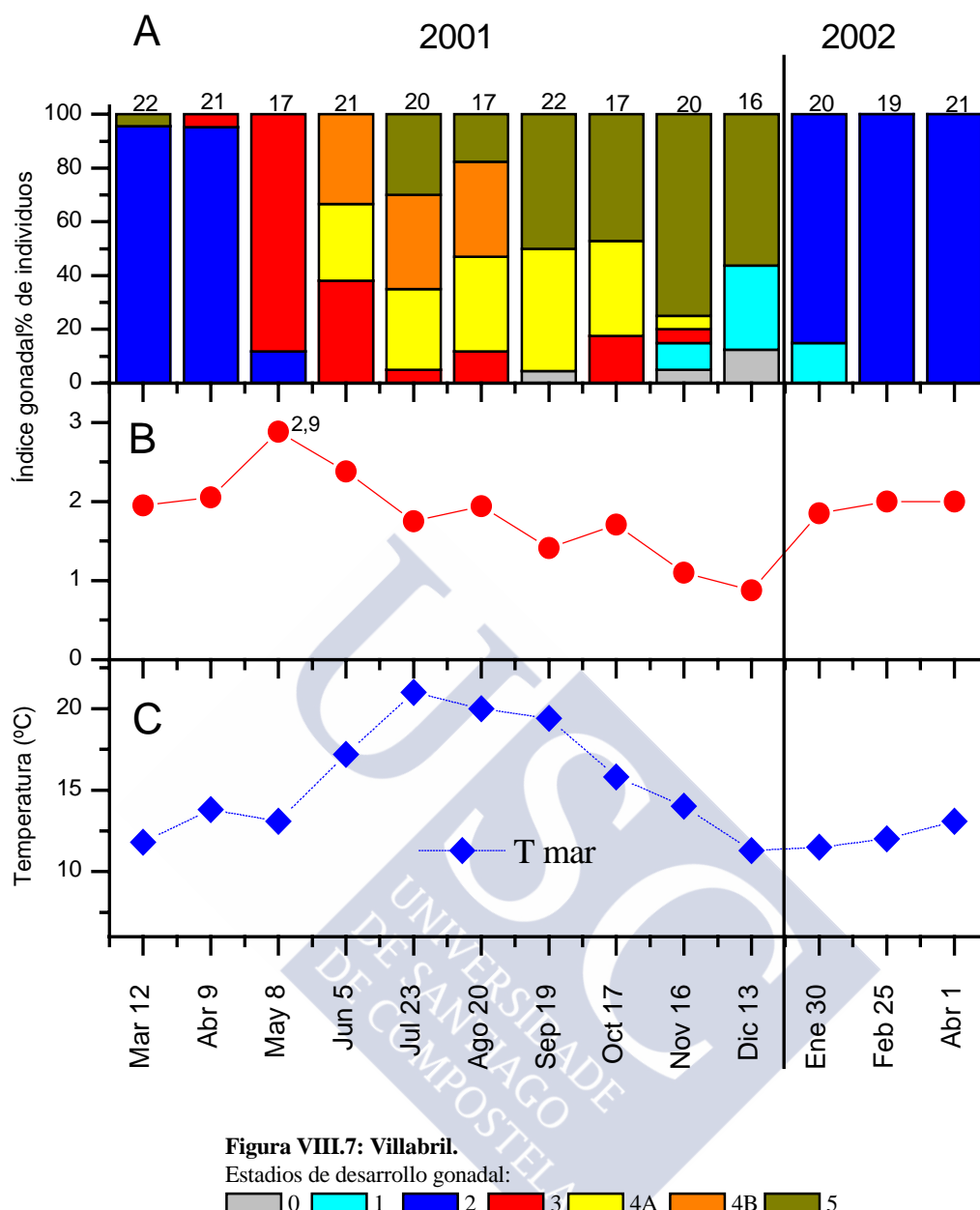
**Figura VIII.6 (página siguiente):** *Misela*. **A.** Distribución mensual de los berberechos en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo gonadal. **B.** Variación del índice gonadal a lo largo del período de estudio. **C.** Variación mensual de la temperatura del agua de mar y del aire. **D.** Concentración media mensual de clorofila *a*.



En *Villabril* (Fig. VIII.7 A, B), el estudio de la condición gonadal comenzó en marzo de 2001, presentando la mayoría de los berberechos gónadas en desarrollo. La madurez se alcanzó a mediados de primavera (88% de los berberechos maduros e IG de 2,9 en la muestra del 8 de mayo). Desde este momento hasta mediados de verano los estadios de post-puesta y restauración gonadal fueron los dominantes. A finales de verano parte de los berberechos iniciaban la reabsorción gonadal y ésta se extendió a lo largo del otoño, hasta principios de invierno, en un porcentaje cada vez mayor de los individuos de la población. Sin embargo, cabe destacar que un importante porcentaje de berberechos continuó en post-puesta y restauración de la gónada, prolongándose esta situación hasta finales del otoño, momento en el que incluso una fracción de la población de *C. edule* presentaba su gónada en un estadio de máxima madurez. Se detectaron muy pocos berberechos en reposo gonadal durante ese período y, sin pausa, se inició de un nuevo ciclo gametogénico. En el año 2002, de nuevo la progresión gonadal se prolongó a lo largo de la primavera y en la muestra del 1 de abril no existía ningún berberecho con la gónada madura.

**Figura VIII.7 (página siguiente):** *Villabril*. **A.** Distribución mensual de los berberechos en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo gonadal. **B.** Variación del índice gonadal a lo largo del período de estudio. **C.** Variación mensual de la temperatura del agua de mar.





**Figura VIII.7: Villabril.**

Estadios de desarrollo gonadal:

0 1 2 3 4A 4B 5

#### VIII.4.3. Parámetros ambientales

En los tres bancos ubicados en el ámbito geográfico de las *Rías Baixas* la salinidad presentó valores propios de zonas euhalinas (valor medio: 33,6 ‰; rango: 29,3-35,2 ‰) bastante estables a lo largo de todo el período de estudio. El banco de *Villabril* se ubica en una zona estuárica con una clara influencia fluvial y por tanto presentó salinidades inferiores (valor medio: 23,8 ‰; rango: 14,0-33,2 ‰), más propias de una zona mixohalina. La variación de la temperatura media mensual del aire (datos no disponibles para el caso de *Villabril*) y del agua de mar se representa en las figuras VIII.4, 5, 6 y 7 C, para *Carril*, *Camaxe*, *Misela* y *Villabril*. El patrón temporal de

variación fue muy similar en los tres bancos ubicados en las *Rías Baixas*, con las temperaturas más frías en los meses de invierno, un incremento progresivo durante la primavera, valores máximos en verano y un ligero descenso durante los meses de otoño. En el caso de *Villabril* el patrón fue similar, aunque las temperaturas medias de los meses de verano y otoño de 2001 en este banco fueron superiores a las registradas en los años 1999 y 2000 en los bancos estudiados en las *Rías Baixas*. En los bancos de las rías del sur se observó una asociación clara entre la aceleración de la gametogénesis y el aumento de la temperatura del aire y del agua de mar que se observa a finales de invierno-principios de primavera.

Las figuras VIII.4, 5 y 6 D muestran la variación temporal de las concentraciones de clorofila *a* en los bancos de *Carril*, *Camaxe* y *Misela* respectivamente. En general los patrones de variación temporal fueron similares en estos bancos durante el período en que los muestreos fueron concurrentes. La concentración de clorofila *a* fue muy baja durante el invierno, se alcanzaron picos de concentración entre mediados y finales de primavera, disminuyendo a continuación los valores un poco en verano. La concentración de clorofila *a* aumentó otra vez a finales de verano en *Carril* y *Misela* pero no lo hizo en *Camaxe*. Un patrón diferente se registró en *Misela* en 1999, con valores muy bajos a principios y mediados de primavera y otoño y valores mayores a finales de primavera y verano. En estos bancos se observó que el segundo pico de IG detectado a mediados de primavera coincidía con valores elevados ( $>4\mu\text{g/L}$ ) de concentración de clorofila *a*.

## VIII.5. DISCUSIÓN

El berberecho *Cerastoderma edule* es una especie dioica. En este estudio se registró una relación machos:hembras de 1:1. Diversos autores ( Boyden 1971; Mejuto 1984a, b; Fernández Castro *et al.* 1989) citan poblaciones de berberecho en las que las hembras aparecían en una proporción mayor. Kingston (1974), sin embargo, encuentra un número ligeramente mayor de machos que de hembras, si bien la relación machos/hembras sólo difirió significativamente de 1:1 para *Cerastoderma glaucum* de una población determinada. Camacho y Román (1984) confirman una relación 1:1 para *C. edule* en la Ría de Arousa. Existen referencias bibliográficas que denotan el hecho de que normalmente en bivalvos los estadios iniciales de desarrollo gonadal de las hembras son más fácilmente reconocibles que los correspondientes a los machos (Boyden 1971; Kingston 1974; Steele & Mulcahy 1999). Este hecho puede contribuir a resultados en los que la proporción de hembras sea significativamente mayor con respecto a los machos, especialmente en aquellos estudios que empleen técnicas de diagnóstico indirectas, como frotis y escalas empíricas de desarrollo gonadal. No se encontró ningún berberecho hermafrodita en el presente estudio, aunque sí fue observado un único caso en un informe patológico realizado en nuestro laboratorio y que implicó el análisis histológico de más de 5000 berberechos de la costa de Galicia (datos no publicados). Kingston (1974) detecta también un caso, entre 4000 berberechos examinados, de un individuo con folículos masculinos y femeninos claramente distinguibles.

El patrón general del ciclo gonadal encontrado en los bancos de berberecho de *Carril* y *Camaxe*, entre el otoño de 1999 y el otoño de 2000, comprendió el inicio de la gametogénesis en otoño y su progresión a través del invierno. Una vez que la madurez gonadal fue alcanzada –en la transición de invierno a primavera- tuvo lugar una puesta a inicios de primavera seguida de la restauración de la gónada. Esto condujo a una nueva madurez de la gónada y un nuevo ciclo de puesta a finales de primavera principios de verano. De nuevo se observó restauración de la gónada durante este período en algunos berberechos que pudieron tener incluso una puesta más. La reabsorción de la gónada comenzó a mediados del verano y el estado de reposo se alcanzó a finales de verano principios de otoño. La variación en la condición gonadal observada en *Misela* a lo largo de 1999 también se ajustó a este patrón, aunque el segundo ciclo de puesta se

prolongó hasta el final del verano. El estadio de reposo fue observado en muestras de *Misela* desde el final de verano hasta finales de otoño de 1999, pero este estadio estuvo prácticamente ausente en este lugar en el siguiente año, si bien cabe destacar que el otoño de 2000 correspondió al período de elevada pluviosidad que dio lugar a descensos extremos de la salinidad y que acabó causando mortalidades masivas de bivalvos en esta zona. Es probable que el estrés ambiental a que se vieron sometidos los berberechos durante este período alterase el desarrollo normal del ciclo gonadal.

En el ciclo gonadal de *Villabril (Rías Altas)* durante el año 2001, la progresión de la gametogénesis se prolongó durante la primavera y el estadio de madurez no se alcanzó hasta mediados de la misma. No tuvo lugar, por tanto, la puesta detectada en primavera temprana en las *Rías Baixas* y solamente se observó un único período de puesta, pero éste fue muy dilatado en el tiempo y comprendió desde mediados de primavera a mediados de otoño. Algunos berberechos regeneraron su gónada a finales de otoño y aún una pequeña puesta pudo tener lugar. En el año 2002, tampoco tuvo lugar puesta en el período de primavera temprana. Esto sugiere que existen diferencias en el patrón del ciclo gametogénico entre las poblaciones de berberecho de las *Rías Altas* y *Baixas*. Sin embargo, debido a que los datos corresponden a años diferentes, no podemos establecerlo como conclusión. Villalba (1995) ya describía diferencias entre las *Rías Altas* y *Baixas* en el ciclo gametogénico de mejillones cultivados *Mytilus galloprovincialis*, implicando también la ausencia de una puesta a principios de primavera en las *Rías Altas*. Mejuto (1984a) describe en *C. edule* de Noia (*Rías Baixas*) que la puesta durante el año 1982 tuvo lugar entre los meses de marzo y mayo –con el máximo de intensidad de la misma en abril-; no existió, sin embargo, constancia de un segundo pico de puesta en verano. Este mismo autor (Mejuto 1984b) encuentra un período de puesta muy prolongado para berberecho de la Ría do Pasaxe (*Rías Altas*) en el año 1983, comenzando en marzo-abril-mayo, alcanzando un máximo en junio, y mostrando un ligero pico a finales de septiembre. González y Pérez Camacho (1984a) describen para *C. edule* de Carril un patrón caracterizado por una fase estacionaria de septiembre a diciembre, inicio de la gametogénesis en enero, y madurez sexual en la población en los meses de marzo, abril y mayo. La puesta tenía lugar entre los meses de marzo y junio. Debido a los métodos poco precisos (métodos indirectos basados en el aspecto externo de la masa visceral y frotis de tejido gonadal) empleados por estos autores, sólo son representativos los datos referentes a épocas de máxima madurez y puesta. Estas épocas coinciden con las descritas en el presente estudio, si bien en

nuestro caso el empleo de técnicas histológicas permitió detectar pulsos de renovación gonadal que dieron lugar a varias puestas, así como definir con exactitud el inicio de la gametogénesis.

Son numerosas las referencias bibliográficas que describen grandes diferencias en el ciclo gametogénico de *Cerastoderma edule* entre poblaciones de diferentes lugares y también dentro de la misma población en diferentes períodos (Tabla VIII.2). De acuerdo con estos datos se infiere un retraso en el período de puesta conforme aumenta la latitud, lo cual sugiere que diferencias en las condiciones ambientales pueden ser las responsables de las diferencias en el patrón reproductivo de poblaciones de distintas ubicaciones, y en una misma población en diferentes períodos de tiempo (Navarro *et al.* 1989).

**Tabla VIII.2:** Períodos de puesta de poblaciones de *Cerastoderma edule* en diferentes regiones europeas.

Zona estudiada	Período de puesta	Referencia
Trondheimsfjorden (Noruega)	Julio	Rygg (1970)
Limfjord (Dinamarca)	Junio	Ivell (1981)
Strangford Lough (Irlanda del Norte)	Junio a Septiembre	Seed & Brown (1975)
Burry Inlet (Sur de Gales)	Abril a Junio (1 <sup>er</sup> año)/Mayo y Otoño (2 <sup>o</sup> año)	Yankson (1986)
Crouch Estuary, Essex (Reino Unido)	Mayo	Boyden (1971)
East Kent coast (Reino Unido)	Mayo-Junio	Kingston (1974)
Tamar Estuary, Cornwall (UK)	De Mayo a Agosto	Newell & Bayne (1980)
Bahía del Sena (Francia)	Mayo-Junio	Gimazane & Lubet (1972a)
Bretaña francesa y costa atlántica de Francia	De Marzo a Octubre	Guillou <i>et al.</i> (1990)
Bahía de Mundaka (País Vasco)	Mayo (1 <sup>er</sup> año)/ Julio (2 <sup>o</sup> año)	Navarro <i>et al.</i> (1989)
Carril, Ría de Arousa (Galicia, NW Spain)	De Marzo a Julio	González & Camacho (1984a)

Entre los factores ambientales influyentes en la gametogénesis de moluscos bivalvos destacan la temperatura, la salinidad, el fotoperíodo y la disponibilidad de alimento (Sastry 1979). Los estudios centrados en el berberecho *Cerastoderma edule*

destacan la temperatura y la disponibilidad de alimento como los factores más influyentes en la gametogénesis (Boyden 1971; Gimazane 1972; Gimazane & Lubet 1972a, b; Kingston 1974; Newell & Bayne 1980; Wolowicz 1987; Navarro *et al.* 1989; Guillou *et al.* 1990). Gimazane (1972) concluye que en condiciones experimentales un aumento de la temperatura del agua desde 8 °C a 14-15 °C reactiva la gametogénesis en *C. edule* que se encontraba en reposo gonadal. Boyden (1971) registra datos de inicio de puesta de *C. edule* a 12,9 y 13,2 °C en aguas de Inglaterra durante dos años consecutivos. Guillou *et al.* (1990) confieren más importancia en la reproducción a la variación térmica que a un valor absoluto de la temperatura. Nuestros resultados en las *Rías Baixas* se ajustaron bien a la idea de cambios térmicos como responsables de aceleración en la gametogénesis. Asimismo los máximos primaverales de condición gonadal –coincidentes con la primera maduración de la gónada dentro del ciclo anual– en estas poblaciones del sur de Galicia tuvieron lugar en un rango de temperaturas del agua de mar de entre 13 y 14 °C. Los datos de la población de *Villabril*, en las *Rías Altas*, corresponden a un año diferente. Sin embargo, la diferencia en el gradiente de temperaturas, así como el retraso con que se alcanzó la temperatura de 14 °C podría contribuir a explicar por qué la madurez en esta población no tuvo lugar hasta mediados de primavera. Asimismo el hecho de que, en esta zona, las temperaturas otoñales en 2001 fuesen superiores a las registradas en los bancos del sur en el año 2000 podría contribuir a explicar por qué el período de puesta y restauración se extendió hasta finales de otoño en este banco.

Otro importante factor determinante del ciclo gametogénico es la disponibilidad de alimento (Sastry 1979; Ruiz *et al.* 1992). Ésta se estimó para las *Rías Baixas*, en el presente estudio, por medio de la concentración de clorofila *a*. Los valores máximos de concentración de clorofila *a* se alcanzaron a mediados de primavera, permitiendo así que las larvas de berberecho derivadas de la puesta de principios de primavera dispusiesen de alimento en abundancia. Este alimento estuvo también disponible para los berberechos adultos y pudo ser utilizado por los mismos para la restauración de la gónada. Aunque la concentración de la clorofila *a* disminuye en verano, probablemente su nivel se mantiene suficientemente alto como para permitir el desarrollo de larvas procedentes de una segunda puesta, e incluso en algunos bancos, para una segunda restauración gonadal de parte de la población de berberechos adultos. Bayne (1976) postula que los bivalvos pueden ser divididos en dos grupos según su patrón reproductivo con respecto a la disponibilidad de alimento: (1) especies “conservadoras”,



en las que la gametogénesis ocurre en otoño – invierno a expensas de las reservas energéticas acumuladas durante el verano anterior; y (2) especies “oportunistas”, cuando el otoño – invierno constituye un período de reposo gonadal y la gametogénesis se retrasa hasta la primavera, momento en el que existe en el medio suficiente alimento para completar la biosíntesis del tejido gonadal. El berberecho parece adoptar una estrategia híbrida en función de las condiciones ambientales, y así la localización temporal del período reproductor viene determinado por las condiciones de disponibilidad de alimento del verano y otoño precedentes (Iglesias & Navarro 1987; Navarro *et al.* 1989). En el caso del presente estudio, debido a que la disponibilidad de alimento era todavía alta a finales de verano – principios de otoño, los berberechos pudieron emplear los nutrientes absorbidos para la síntesis de reservas de carbohidratos (Newell & Bayne 1980; Navarro *et al.* 1989) que serían la fuente de energía para el inicio y mantenimiento de la gametogénesis durante los meses de invierno. Se produce también una redistribución de la energía a través de la reabsorción gonadal, que implica una fagocitosis de los gametos por parte de los hemocitos (Gimazane & Lubet 1972a). Sin embargo, la regulación del ciclo gonadal parece corresponder, en último término, a la segregación de sustancias de naturaleza neuroendocrina, donde la temperatura y otros factores externos “sincronizadores” jugarían un papel fundamental, tanto como desencadenantes del inicio de la maduración gametogénica como de su duración (Gimazane 1972; Gimazane & Lubet 1972b; Sastry 1979). Si la restauración gonadal y puesta tuviesen lugar en otoño, las larvas estarían expuestas a la ausencia de alimento y las bajas temperaturas de finales de otoño-principios de invierno, resultando imposible su viabilidad. Se comprometería además el desarrollo gametogénico de la población reproductora de manera previa a los primeros blooms de fitoplancton de la primavera siguiente. Carecemos de datos de disponibilidad de alimento en *Villabril*, pero el hecho de que tuviese lugar regeneración de la gónada y puesta en una época tan tardía como finales de otoño, implica que se haya producido un gasto energético previo a la época invernal. Se compromete así la consecución de un desarrollo suficientemente rápido de la gónada como para que la población alcance una madurez y puesta tan temprana como en el caso de las poblaciones del sur de Galicia. Con el fin de confirmar estas hipótesis sería necesario realizar estudios accesorios de seguimiento del ciclo gonadal y parámetros ambientales en poblaciones del sur y norte de Galicia en períodos de tiempo coincidentes.



**IX. INFLUENCIA DE VARIAS ALTERACIONES  
PATOLÓGICAS SOBRE LA CONDICIÓN  
GONADAL DEL BERBERECHO *Cerastoderma edule*  
(L.) DE LA COSTA DE GALICIA:  
NEOPLASIA DISEMINADA, ESPOROQUISTES DE  
*Labratrema minimus* Y ENFERMEDAD DE LOS  
FOCOS GRANDES DE INFILTRACIÓN  
HEMOCITARIA INTENSA**

---



## **IX. INFLUENCIA DE VARIAS ALTERACIONES PATOLÓGICAS SOBRE LA CONDICIÓN GONADAL DEL BERBERECHO *Cerastoderma edule* (L.) DE LA COSTA DE GALICIA: NEOPLASIA DISEMINADA, ESPOROQUISTES DE *Labratrema minimus* Y ENFERMEDAD DE LOS FOCOS GRANDES DE INFILTRACIÓN HEMOCITARIA INTENSA**

### **IX.1. RESUMEN**

Se estudia la asociación existente entre el desarrollo de tres alteraciones patológicas (neoplasia diseminada, esporoquistes del trematodo bucephalideo *Labratrema minimus* y enfermedad de los FGIHI) y la condición gonadal de berberechos *C. edule* adultos de las Rías gallegas. Se abordan cuestiones como la relación existente entre el ciclo gonadal y el patrón de desarrollo de la enfermedad y el efecto del sexo de los individuos en la susceptibilidad a cada enfermedad. Se detectaron incrementos en la prevalencia de neoplasia diseminada en berberechos del banco de *Misela* de forma coincidente con disminuciones intensas en el índice gonadal. Parece que la puesta constituye un factor de estrés que provoca que nuevos individuos contraigan la enfermedad. Asimismo los berberechos afectados por neoplasia diseminada intensa presentaron mayores porcentajes de estadios gametogénicos de reposo y/o reabsorción con respecto a individuos sanos. No se detectaron diferencias en la prevalencia e intensidad de neoplasia diseminada entre berberechos machos y hembras, pero sí entre éstos y los de sexo indeterminado. Los berberechos de *Villabril* con infestaciones avanzadas de esporoquistes de trematodos presentaron castración gonadal. Ambos sexos se vieron afectados en igual proporción. El ciclo de desarrollo gonadal no parece influir en la susceptibilidad de los berberechos a la enfermedad de los FGIHI. El impacto de esta enfermedad en el ciclo gametogénico del berberecho fue similar en los dos bancos estudiados (*Carril* y *Sarrido*), detectándose mayores proporciones de individuos con su gónada en reposo y/o reabsorción conforme se incrementaba el grado de intensidad de la alteración. En el caso de *Sarrido*, si bien la prevalencia de la enfermedad no difirió entre sexos, los machos e individuos de sexo indeterminado presentaban mayores intensidades que las hembras. En *Carril* no se observó asociación entre el desarrollo de los FGIHI y el sexo. Considerando las prevalencias medias elevadas registradas en ciertos bancos de berberecho para las tres alteraciones estudiadas, éstas pueden suponer un efecto negativo en el potencial

reproductor del berberecho a nivel poblacional, especialmente en el caso de la enfermedad de los FGIHI.

## SUMMARY

The association between three important cockle pathologies (disseminated neoplasia, *L. minimus* sporocysts and occurrence of LFHHI) and gonadal condition was assessed in adult cockles from Galician Rias. The relationship between gonadal cycle and diseases development pattern and the sex effect on the cockle sensitivity to each disease was also studied. In *Misela* there were detected increments in the prevalence of disseminated neoplasia coinciding in time with drops of the gonadal index, suggesting that spawning could act as an stressor factor which promote new cockles to contract the disease. Cockles affected by high intensities of disseminated neoplasia had higher proportions of resting and/or resorting gonads than healthy ones. No differences were observed in the prevalence and intensity of disseminated neoplasia between males and females, however both parameters were greater in sexually undifferentiated cockles. Cockles from *Villabril* with high intensities infestations of *L. minimus* sporocysts showed castration. Both sexes were equally affected. LFHHI occurrence seemed independent of cockle gonadal cycle. There were observed higher proportions of resting and/or resorting gonads between cockles affected by high intensities of the disease than in healthy cockles. There were not detected any association between sex and the development of LFHHI. In *Sarrido*, even when the prevalence of LFHHI was not sex dependent, the development of the disease seemed to progress quickly within males. These three diseases can exert a negative effect on the reproduction potential of cockle populations, specially LFHHI occurrence.



## IX.2. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente los estudios patológicos en bivalvos marinos han estado centrados de manera preferente en la influencia de los parásitos y alteraciones patológicas en la supervivencia del hospedador. Existen sin embargo, efectos subletales sobre las poblaciones del hospedador que también pueden suponer implicaciones graves. Así, los efectos que las alteraciones patológicas pueden ejercer sobre la capacidad reproductora de los individuos de una población de bivalvos podrían condicionar la continuidad temporal de ésta y, por tanto, su explotabilidad si se trata de una especie comercial.

El fenómeno de “castración” de bivalvos causada por el desarrollo de larvas de trematodos está ampliamente documentado (Lauckner 1983). Se han descrito casos de disminución en el índice de condición gonadal en individuos juveniles de *Crassostrea virginica* afectados por neoplasia diseminada (Ford *et al.* 1997) así como una disminución en la fecundidad de una población de *Mya arenaria* afectada por altas prevalencias de una neoplasia gonadal (Barber 1996). Existen ejemplos de protistas con un efecto negativo en el potencial reproductor: *Crassostrea virginica* de la costa atlántica de Estados Unidos parasitada por *Haplosporidium nelsoni* (Barber *et al.* 1988; Ford *et al.* 1990), *Ostrea edulis* afectada por *Marteilia refringens* en la costa atlántica francesa (Robert *et al.*, 1991) y, afectando a poblaciones de bivalvos explotados en Galicia, la infección del mejillón *Mytilus galloprovincialis* por *Marteilia refringens* (Villalba *et al.*, 1993b) y poblaciones de almeja fina *Tapes decussatus* parasitadas por *Perkinsus atlanticus* (Casas 2001, Casas & Villalba 2005).

En el estudio expuesto en este capítulo se evalúa la relación existente entre la dinámica de las tres alteraciones de mayor importancia descritas en las poblaciones de berberecho de Galicia: neoplasia diseminada, esporoquistes del trematodo *Labratrema minimus* (Bucephalidae) y enfermedad de los focos grandes de infiltración hemocitaria intensa, y el ciclo gonadal de este bivalvo. Se estudiará: (i) la relación existente entre el ciclo gonadal y la dinámica temporal de la prevalencia; (ii) la existencia de asociación entre la intensidad de cada enfermedad y los diferentes estadios de desarrollo gonadal; (iii) la posible asociación entre estas enfermedades y el sexo de los individuos.

### IX.3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### IX.3.1. Poblaciones estudiadas

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron las preparaciones histológicas ya analizadas en los estudios expuestos en capítulos anteriores y correspondientes a individuos adultos de talla comercial ( $L > 28$  mm) de las siguientes poblaciones de berberecho:

- *Misela* (Ría de Noia): para el estudio de la interacción existente entre neoplasia diseminada y el ciclo reproductivo.
- *Villabril* (Ría de O Barqueiro): para estudiar el efecto de la parasitación por esporoquistes de *Labratrema minimus* en la reproducción del berberecho. Para el análisis de la posible influencia del ciclo reproductor del berberecho en la susceptibilidad a la parasitación por *L. minimus* se analizaron berberechos de *Misela*, *Lombos do Ulla* y *Villabril*, ya que en estas poblaciones se estudió la dinámica de infestación de este parásito (capítulo VI), que había sido relacionada con el ciclo reproductivo de berberechos en estudios previos (Bowers 1969).
- *Carril* y *Sarrido* (Ría de Arousa): para el estudio de la asociación entre FGIHI y el ciclo gonadal.

#### IX.3.2. Determinación de la condición gonadal y cuantificación de la intensidad de cada alteración patológica

El análisis de los cortes histológicos implicó la determinación de la condición gonadal y de la intensidad de las distintas enfermedades. La determinación de la condición gonadal se realizó mediante la metodología expuesta en el apartado VIII.3.2. de la presente memoria, definiendo el estadio de desarrollo gonadal de cada individuo y calculando el índice gonadal correspondiente a cada muestra mensual. La prevalencia de cada enfermedad se calculó como el porcentaje de berberechos afectados en cada muestra mensual. La intensidad se cuantificó de forma individual para cada berberecho mediante la aplicación de las siguientes escalas:

- Para el caso de neoplasia diseminada se empleó la escala modificación de la de Mix (1983) ya descrita en la sección IV.3.2.7., y que distingue un total de 5 estados (0, 1, 2, 3 y 4) en función del grado de propagación de las células neoplásicas en los tejidos del hospedador.

- Con respecto a la infestación por esporoquistes del trematodo bucephalideo *Labratrema minimus*, se diferenciaron también 4 niveles de intensidad:

**NI:** *Ausencia de infestación.* No se detectan esporoquistes en los cortes histológicos analizados.

**II:** *Infestación ligera.* Fase inicial de infestación. Se observan esporoquistes invadiendo zonas muy localizadas de la gónada, y conteniendo bolas germinales en su interior.

**IM:** *Infestación moderada.* Los esporoquistes se extienden invadiendo buena parte del tejido gonadal; en su interior se diferencian bolas germinales y cercarias en diferentes fases de desarrollo.

**IA:** *Infestación avanzada.* Los esporoquistes ocupan toda la gónada – causando en la mayor parte de los casos la castración completa del hospedador– e invaden otros órganos como glándula digestiva, branquias y riñón.

- En el caso de la enfermedad de los FGIHI se distinguieron 4 niveles de intensidad (0, 1, 2, 3) según el grado de extensión de los focos en los tejidos de los berberechos (apartado VII.3.2.1).

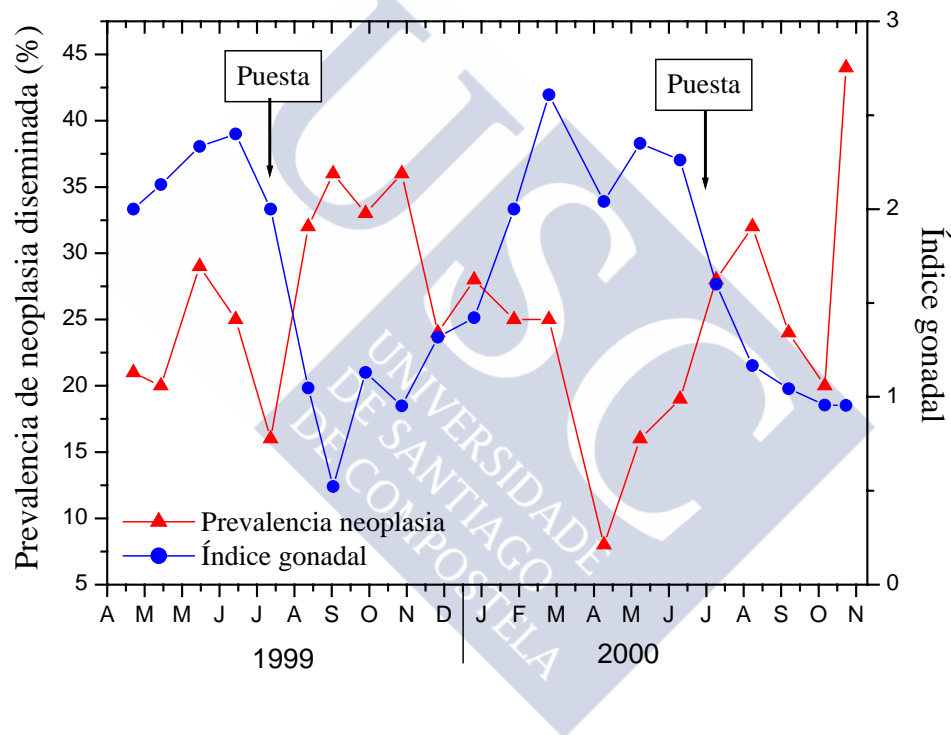
### **IX.3.3. Análisis estadísticos**

La existencia de asociación entre la intensidad de cada alteración y los diferentes estadios de desarrollo gonadal se evaluó mediante tablas de contingencia en las que las filas las constituyeron las categorías de intensidad de afectación y las columnas los distintos estadios de desarrollo gonadal, analizadas empleando el estadístico Chi-cuadrado. En ciertos casos, por motivos de cumplimiento de los requerimientos teóricos del test, se procedió al agrupamiento de categorías tanto de condición gonadal como de intensidad de la enfermedad. Para la realización de los análisis se eliminaron aquellos berberechos que presentaban intensidades importantes de otras alteraciones patológicas. Igualmente se emplearon tablas de contingencia analizadas mediante el estadístico Chi-cuadrado para estudiar la existencia de asociación entre la intensidad de las enfermedades y el sexo de los individuos. Todos estos análisis se realizaron mediante la aplicación informática de estadística MINITAB 14.0.

## IX.4. RESULTADOS

### IX.4.1. Ciclo gonadal y dinámica temporal de la neoplasia diseminada

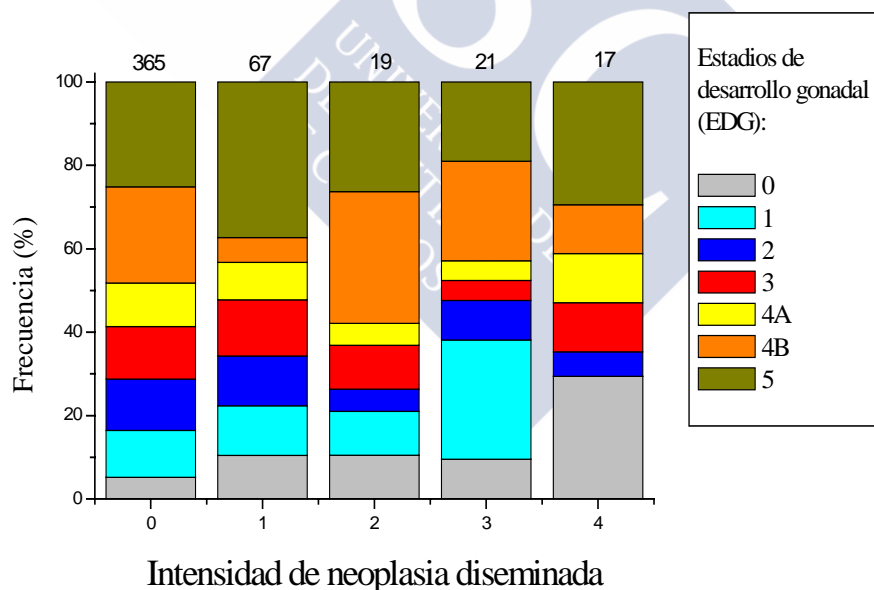
En la Figura IX.1 se aprecia la evolución temporal de la neoplasia diseminada y del índice de gonadal en berberechos de *Misela* entre los años 1999 y 2000. En los dos años se observa un aumento importante de la prevalencia de la neoplasia al final del verano de forma coincidente con la liberación de los gametos.



**Figura IX.1:** Evolución temporal del índice gonadal y la prevalencia de neoplasia diseminada en el banco de berberecho de *Misela*.

#### IX.4.2. Efectos de la neoplasia diseminada en el desarrollo gonadal

En la Figura IX.2 se representa la distribución de todos los individuos analizados en este estudio, correspondientes a la población de berberecho de *Misela*, entre cada uno de los 7 estadios de desarrollo gonadal y las distintas clases de intensidad de neoplasia diseminada. Se observa que en la clase con mayor intensidad de neoplasia diseminada (4) hasta un 29% de los individuos mostraban una gónada sin desarrollo (EDG 0), frente al 5% de individuos en la clase libre de neoplasia diseminada. Asimismo si se consideran los estadios de progresión gonadal (EDG: 1 + 2 + 3 + 4B) éstos aparecían en un menor porcentaje (29%) en la categoría de máxima intensidad de neoplasia con respecto al resto de clases (59% en los no afectados por la alteración). El análisis estadístico reveló una asociación significativa entre el grado de intensidad de neoplasia diseminada y el estadio de desarrollo gonadal ( $\chi^2=39,556$ ; GL=24; P=0,024).



**Figura IX.2:** Distribución de los berberechos de acuerdo con el estadio de desarrollo gonadal y la intensidad de neoplasia diseminada. El número indicado en la parte superior de cada barra se refiere al total de individuos de cada categoría de intensidad.

En la Tabla IX.1 se detallan los resultados de las distintas pruebas estadísticas realizadas para analizar las diferencias existentes en la condición gonadal entre clases de intensidad de neoplasia diseminada. En la misma se puede apreciar que existen diferencias significativas entre los individuos libres de neoplasia y los que presentan intensidades de neoplasia ligeras (1); así como entre los individuos libres de neoplasia y los que presentan mayores niveles de la enfermedad (4).

**Tabla IX.1:** Resultados de las pruebas de  $\chi^2$  realizadas para analizar las diferencias en condición gonadal entre clases de intensidad de neoplasia diseminada. *n.c.*=cálculo no realizado por falta de individuos suficientes en todas las categorías; *n.s.*= $P>0,05$ : valor de  $\chi^2$  no significativo; \*= $0,05>P>0,01$ ; \*\*= $0,01>P>0,001$ ; \*\*\*= $P<0,001$

CATEGORÍAS DE INTENSIDAD	N	G.L.	Chi-cuadrado	P	
0 vs 1 vs 2 vs 3 vs 4	489	24	39,556	0,024	*
0 vs 1	432	6	13,902	0,031	*
0 vs 2	384	6	2,803	0,833	<i>n.s.</i>
0 vs 3	386	6	7,650	0,265	<i>n.s.</i>
0 vs 4	382	6	18,683	0,005	**
1 vs 2	86	6	9,864	0,131	<i>n.s.</i>
1 vs 3	88	6	10,881	0,092	<i>n.s.</i>
1 vs 4	84	6	6,923	0,328	<i>n.s.</i>
2 vs 3	40	6	2,776	<i>n.c.</i>	
2 vs 4	36	6	5,525	<i>n.c.</i>	
3 vs 4	38	6	9,365	0,154	<i>n.s.</i>

Con el fin de obtener información más detallada acerca de la influencia de la intensidad de neoplasia diseminada en la condición gonadal en distintas etapas del ciclo gonadal de berberechos de *Misela*, se analizó dicha influencia en tres períodos diferentes definidos en base al ciclo gametogénico descrito en el capítulo VIII (Figura IX.3). Se distinguieron así: un período de **reabsorción y reposo gonadal** –propio de los meses de septiembre, octubre y noviembre de 1999, y agosto, septiembre, octubre y noviembre de 2000–; un período de **gametogénesis activa** –mayoritario en los meses de diciembre de 1999, enero y febrero de 2000–; y un período de **madurez y liberación de gametos** –que comprendió principalmente los meses de abril, mayo, junio, julio y agosto de 1999; y marzo, mayo, junio y julio de 2000–. Debido a que no existían individuos en todas las categorías no fue posible realizar los correspondientes tests estadísticos, sin embargo el análisis de las gráficas representadas en la Figura IX.3

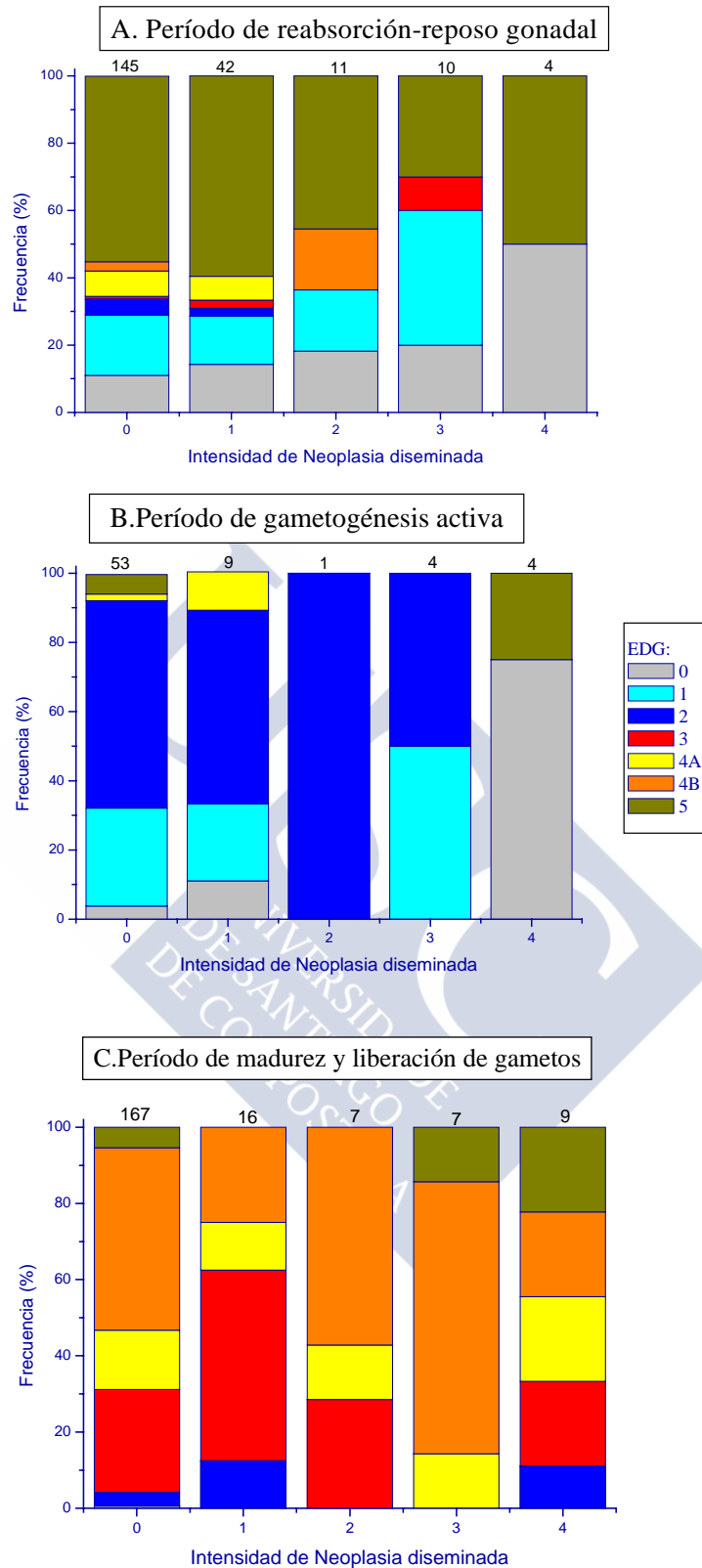


permite apreciar ciertas tendencias en relación al desarrollo gonadal según el grado de intensidad de la neoplasia diseminada.

En la Figura IX.3-A, que refleja la distribución de los berberechos según su estadio de desarrollo gonadal y el nivel de intensidad de neoplasia diseminada en el período de reabsorción y reposo gonadal, se aprecia que la proporción de individuos con su gónada en un estadio de reposo (EDG 0) es mayor conforme la intensidad de neoplasia diseminada aumenta, de manera que sólo un 11 % de los individuos libres de la enfermedad presentan su gónada en reposo, y este porcentaje llega al 50 % en el caso de los berberechos que presentan un nivel máximo de intensidad (4). El 50 % restante de individuos de este nivel se encuentran en un estadio de reabsorción gonadal, lo cual contrasta con el resto de niveles en el que este estadio convive con cierto porcentaje de individuos en otros estadios de gametogénesis más activa (EDG: 1, 2, 3, 4B y 4A).

En el caso del período de gametogénesis activa (Figura IX.3-B) de nuevo se observa que el porcentaje de individuos con su gónada en reposo es mayoritario en el nivel máximo de intensidad de la alteración (4), alcanzando un valor del 75 %, y presentando el 25 % restante su gónada en reabsorción. El resto de niveles de intensidad de neoplasia presentan sin embargo en proporciones mayoritarias individuos en estadios de progresión del desarrollo gametogénico.

Con respecto al período de madurez y liberación de gametos (Figura IX.3-C), las diferencias entre niveles de intensidad de neoplasia no son tan claras, pero sí se observa una tendencia creciente en el porcentaje de individuos con su gónada en reabsorción (EDG 5) en los dos niveles máximos de intensidad (3 y 4).



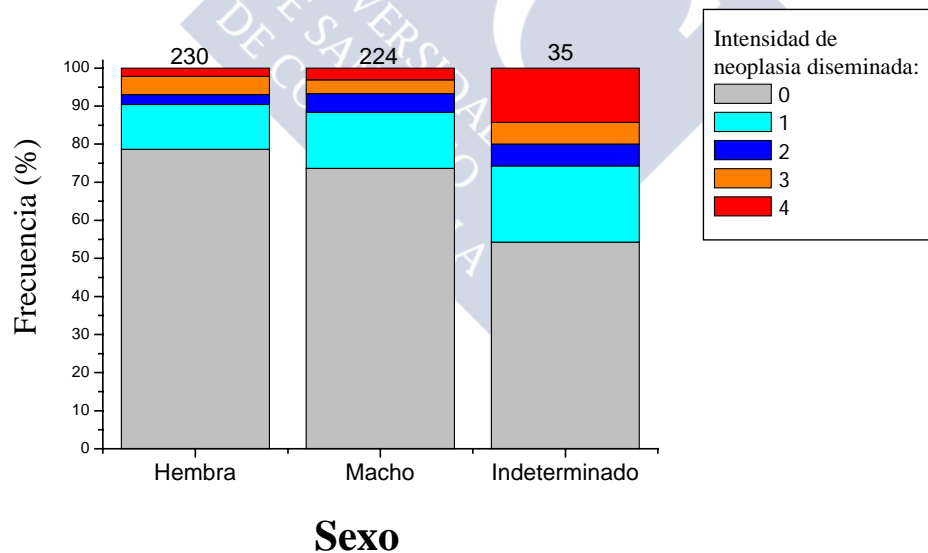
**Figura IX.3:** Distribución de los berberechos de acuerdo con el estadio gonadal y la intensidad de neoplasia diseminada en tres períodos distintos. El número indicado en la parte superior de cada barra se refiere al total de individuos de cada categoría de intensidad de neoplasia.

### IX.4.3. Asociación entre la neoplasia diseminada y el sexo

El análisis de la asociación entre los niveles de intensidad de neoplasia diseminada y el sexo mostró que existían diferencias significativas entre los individuos de sexo indeterminado, machos y hembras, pero no entre machos y hembras. El porcentaje de individuos libres de la alteración fue menor –así como el porcentaje de individuos afectados por neoplasia mayor- en aquellos de sexo indeterminado que en el caso de machos y hembras (Tabla IX.2; Fig. IX.4).

**Tabla IX.2:** Resultados de pruebas de  $\chi^2$  realizadas para analizar las diferencias en intensidad de neoplasia entre sexos. *n.c.*=cálculo no realizado por falta de individuos suficientes en todas las categorías; *n.s.*= $P>0,05$ : valor de  $\chi^2$  no significativo; \*= $0,05>P>0,01$ ; \*\*= $0,01>P>0,001$ ; \*\*\*= $P<0,001$

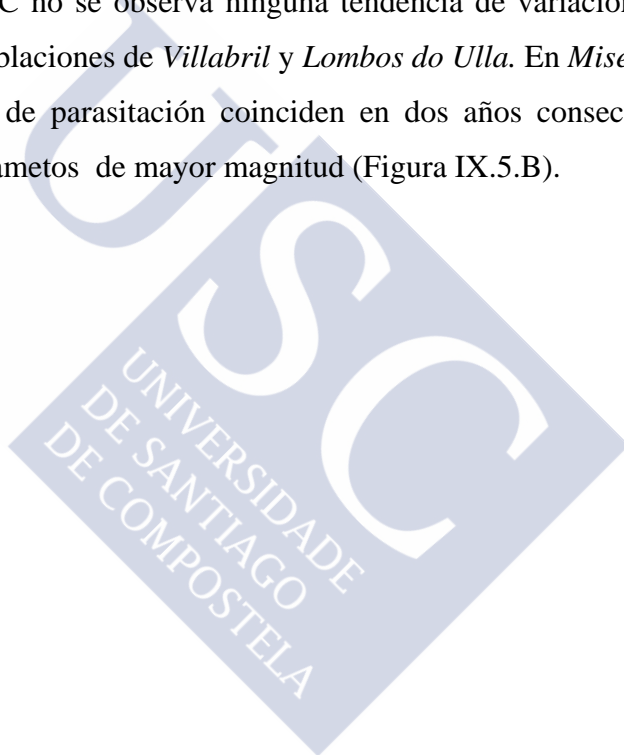
SEXO	N	G.L.	Chi-cuadrado	P	
Hembras vs Machos vs Indeterminados	489	8	19,714	0,011	*
Hembras vs Machos	454	4	3,539	0,472	<i>n.s.</i>
Hembras vs Indeterminados	265	4	16,847	0,002	**
Machos vs Indeterminados	259	4	10,680	0,030	*



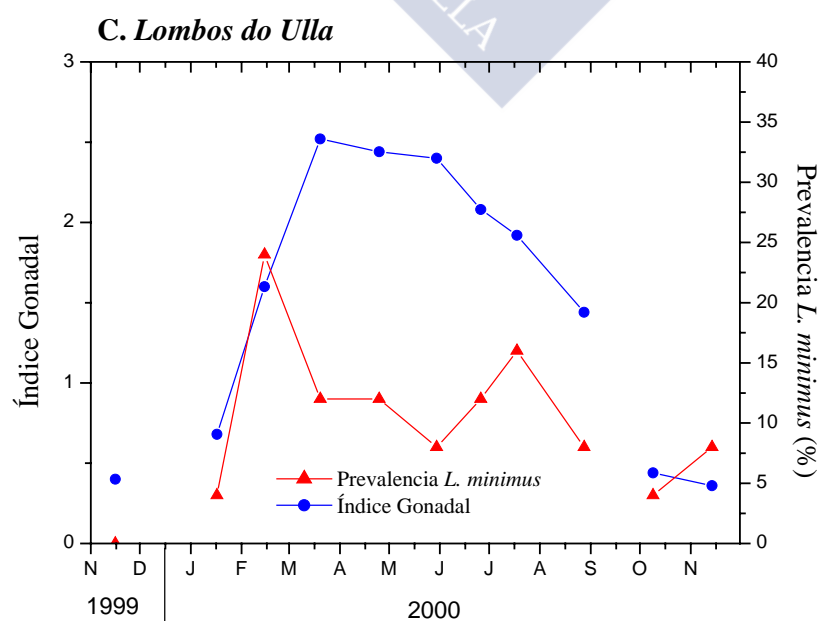
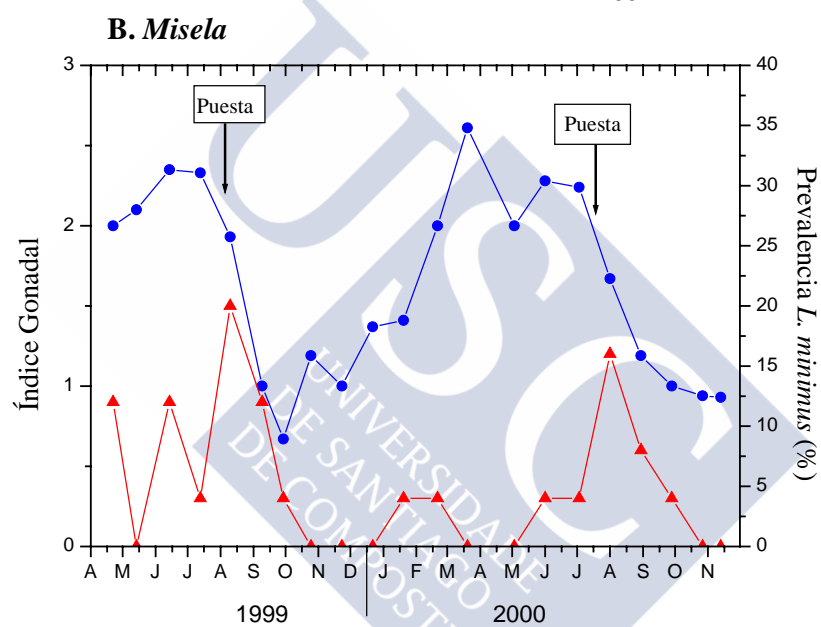
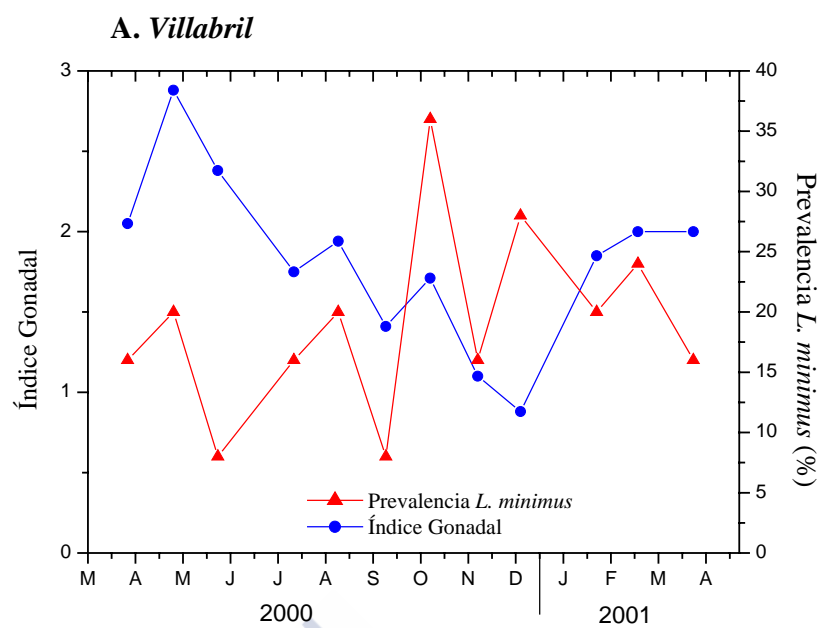
**Figura IX.4:** Distribución de los berberechos en función del sexo y la intensidad de neoplasia diseminada. El número indicado sobre cada columna corresponde al total de berberechos en cada categoría sexual.

#### **IX.4.4. Ciclo gonadal y dinámica temporal de infestación por esporoquistes de *Labratrema minimus***

El estudio de la dinámica temporal de infestación por esporoquistes de *L. minimus* en relación al ciclo de desarrollo gonadal de berberecho se abordó en *Villabril*, entre noviembre de 2000 y noviembre de 2001; en *Misela*, entre abril de 1999 y noviembre de 2000, y en *Lombos do Ulla*, entre noviembre de 1999 y noviembre de 2000. En la Figura IX.5 se aprecia el patrón de variación temporal de la prevalencia mensual de *L. minimus* y el índice gonadal en las poblaciones estudiadas. En el análisis de las Figuras IX.5 A y C no se observa ninguna tendencia de variación conjunta de ambas variables en las poblaciones de *Villabril* y *Lombos do Ulla*. En *Misela* los valores máximos de prevalencia de parasitación coinciden en dos años consecutivos con el evento de liberación de gametos de mayor magnitud (Figura IX.5.B).



**Figura IX.5 (página siguiente):** Evolución temporal del índice gonadal y la prevalencia de infestación por esporoquistes de *Labratrema minimus* en las poblaciones de berberecho de (A) *Villabril*, (B) *Misela* y (C) *Lombos do Ulla*.



#### IX.4.5. Efectos de los esporoquistes de *Labratrema minimus* en el desarrollo gonadal

El estudio de la influencia de la intensidad de infestación por esporoquistes de *Labratrema minimus* sobre la condición gonadal de los berberechos se llevó a cabo en la población de *Villabril*, ya que es en ésta donde se registraron las mayores prevalencias de parasitación. Para ello fue necesario acumular las clases de intensidad de infestación en 3 categorías: *NI*, no infestado; *IL&IM*, infestaciones ligeras y moderadas; e *IA*, infestación avanzada; y los estadios de desarrollo gonadal en 5, que son los siguientes: reposo (EDG 0), gametogénesis activa (EDG 1 + 2), madurez–regeneración gonadal (EDG 3 + 4B), post-puesta (EDG 4A) y reabsorción (EDG 5). La Figura IX.6 representa la distribución de todos los individuos estudiados según su pertenencia a las diferentes categorías de intensidad de infestación y estadios de desarrollo gonadal. Asimismo la Tabla IX.3 muestra los resultados de las diferentes pruebas estadísticas llevadas a cabo para valorar la influencia de la infestación por esporoquistes en la condición gonadal.

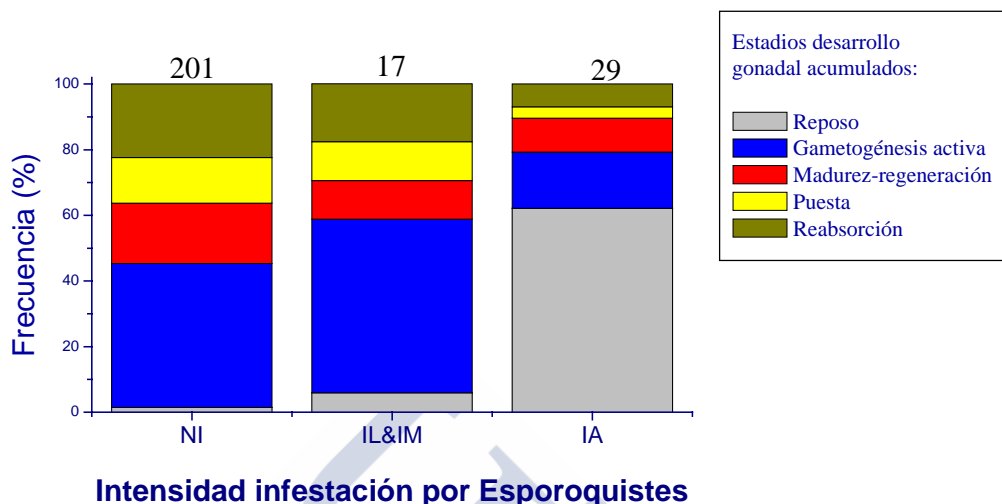
**Tabla IX.3:** Resultados de las pruebas de  $\chi^2$  realizadas para analizar las diferencias en condición gonadal entre clases de intensidad de infestación por esporoquistes de *Labratrema minimus*. *NI*, no infestado; *IL&IM*, infestaciones ligeras y moderadas; *IA*, infestación avanzada. *n.c.*=cálculo no realizado por falta de individuos suficientes en todas las categorías; *n.s.*= $P>0,05$ : valor de  $\chi^2$  no significativo;  $*=0,05>P>0,01$ ;  $**=0,01>P>0,001$ ;  $***=P<0,001$

CATEGORÍAS DE INTENSIDAD DE INFESTACIÓN	N	G.L.	Chi-cuadrado	P	
<i>NI vs IL &amp; IM vs IA</i>	247	8	116,078	0,000	***
<i>NI vs IL &amp; IM</i>	218	4	2,542	<i>n.c.</i>	
<i>NI vs IA</i>	230	4	112,402	0,000	***
<i>IL &amp; IM vs IA</i>	46	4	14,975	0,005	**

No fue posible valorar estadísticamente la existencia de diferencias en la condición gonadal entre los berberechos sanos y los afectados de manera ligera y moderada, sin embargo se confirmó de manera clara la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la condición gonadal de la clase de infestación intensa frente al resto de categorías de infestación (Tabla IX.3). Del análisis de la Figura IX.6 se deduce el efecto claro de incremento de la proporción de individuos con su gónada en reposo, así como la disminución del porcentaje de individuos con su gónada en estadios de desarrollo gametogénico activo, en la categoría de máxima intensidad de infestación,

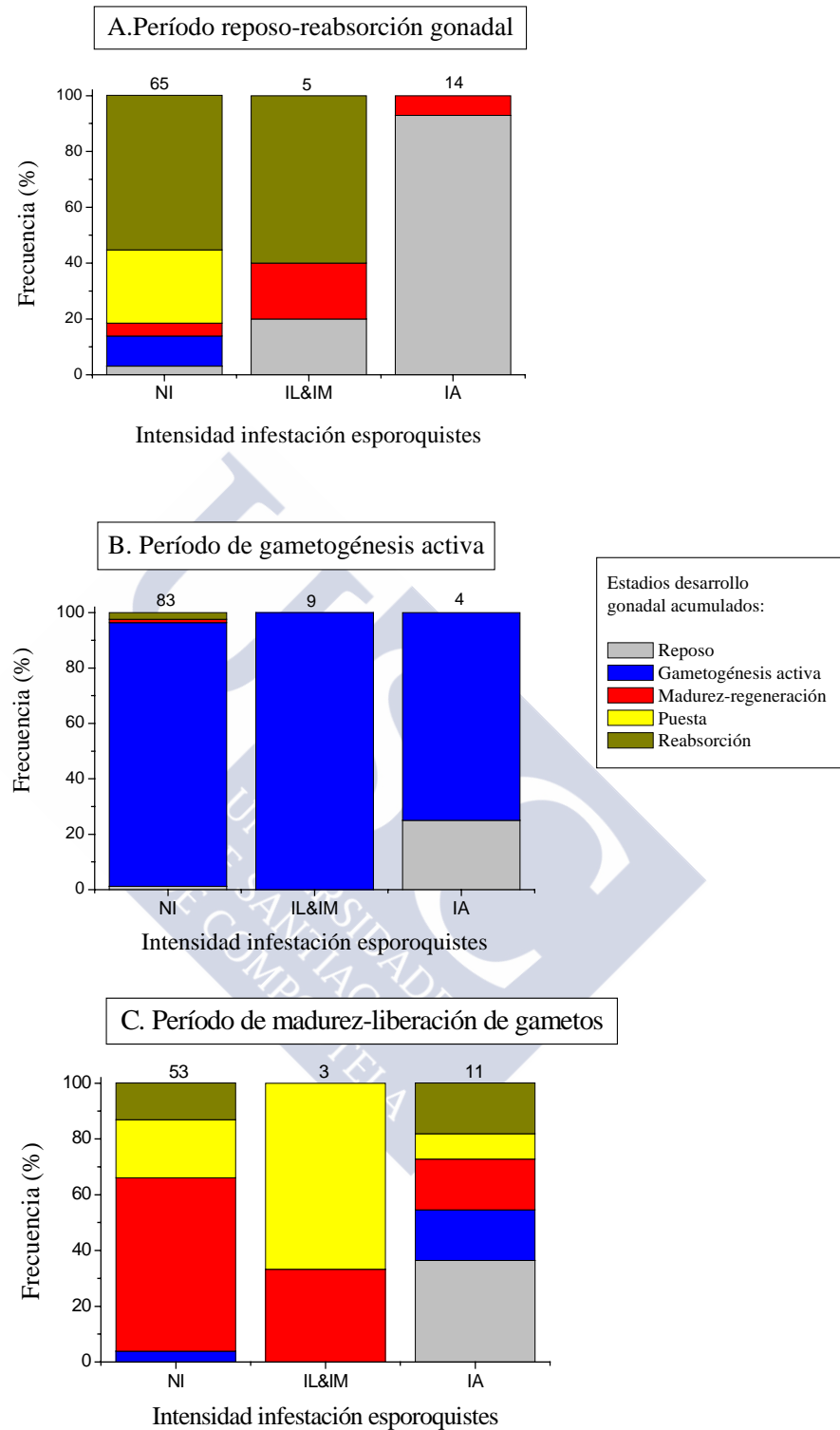


con respecto a los individuos sanos y los que presentan infestaciones ligeras y moderadas.



**Figura IX.6:** Distribución de los berberechos según su condición gonadal e intensidad de infestación por esporoquistes de *Labratrema minimus*. *NI*, no infestado; *IL&IM*, infestaciones ligeras y moderadas; *IA*, infestación avanzada. Sobre cada columna se indica el número de individuos que componen cada categoría de intensidad de infestación.

En este caso se procedió también a contextualizar el estudio del efecto de la infestación por esporoquistes sobre la condición gonadal en tres etapas diferentes del ciclo gametogénico de los berberechos de *Villabril*. Fueron las siguientes: período de **reposo y reabsorción gonadal** –meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre de 2001–; de **gametogénesis activa** –marzo y abril de 2001, y enero, febrero y abril de 2002–; y período de **maduración y liberación de gametos** –en mayo, junio, julio y agosto de 2001–. No fue posible el cálculo del estadístico chi-cuadrado correspondiente a las tablas de contingencia de cada uno de los períodos debido a que no había individuos en alguna de las categorías. El análisis de las gráficas (Figura IX.7) confirma en los tres períodos la tendencia detectada en el test general, de manera que la categoría de máxima intensidad de infestación presenta, con respecto al resto de categorías, un porcentaje claramente mayor de individuos con su gónada en reposo.



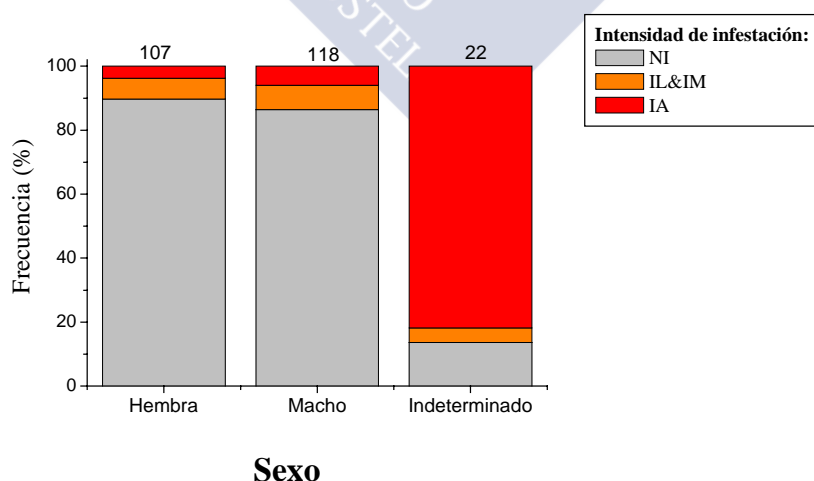
**Figura IX.7:** Distribución de berberechos del banco de *Villabril* según su condición gonadal y categorías de intensidad de parasitación por esporoquistes de *Labratrema minimus* en tres períodos distintos del ciclo gonadal. *NI*, no infestado; *IL&IM*, infestaciones ligeras y moderadas; *IA*, infestación avanzada.

#### IX.4.6. Asociación entre la parasitación por esporoquistes de *Labratrema minimus* y el sexo

El análisis de la asociación entre las categorías de intensidad de parasitación y el sexo de los individuos hospedadores (Tabla IX.4) mostró que existían diferencias significativas en el porcentaje de individuos pertenecientes a cada nivel de intensidad según su sexo ( $\chi^2=115,227$ , GL=4,  $P=0,000$ ). Sin embargo estas diferencias no se debieron a la caracterización de los individuos como machos o hembras ( $\chi^2=0,714$ , GL=2,  $P=0,700$ ), sino al grupo de individuos de sexo indeterminado que, como se observa en la Figura IX.8, presenta un porcentaje significativamente mayor –con respecto al grupo de machos y hembras– de individuos con infestaciones intensas por esporoquistes del trematodo digeneo *Labratrema minimus*.

**Tabla IX.4:** Resultados de pruebas  $\chi^2$  realizadas para analizar las diferencias en la intensidad de parasitación por *L. minimus* entre sexos. *n.c.*=cálculo no realizado por falta de individuos suficientes en todas las categorías; *n.s.*= $P>0,05$ : valor de  $\chi^2$  no significativo;  $*=0,05>P>0,01$ ;  $**=0,01>P>0,001$ ;  $***=P<0,001$

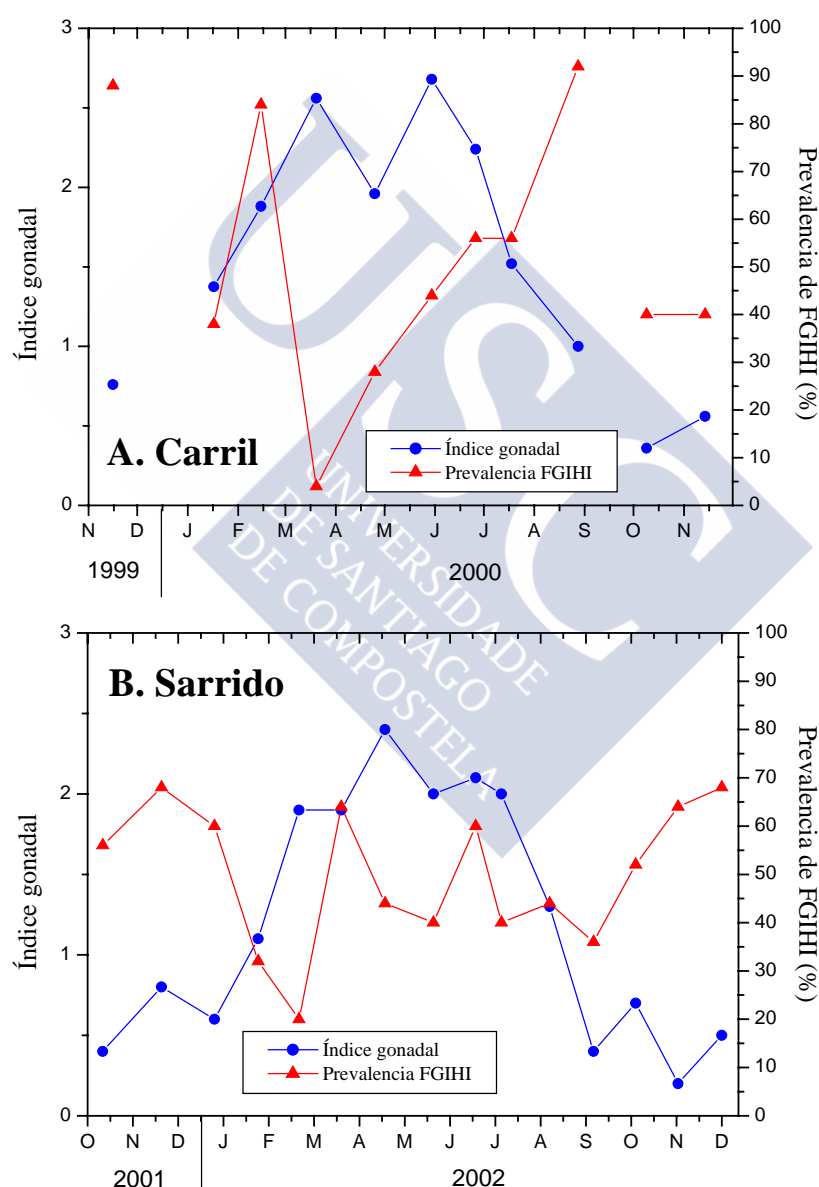
SEXO	N	G.L.	Chi-cuadrado	P	
Hembras vs Machos vs Indeterminados	247	4	115,227	0,000	***
Hembras vs Machos	225	2	0,714	0,700	<i>n.s.</i>
Hembras vs Indeterminados	129	2	79,114	0,000	***
Machos vs Indeterminados	140	2	73,149	0,000	***



**Figura IX.8:** Distribución de berberechos en función del sexo y la intensidad de parasitación por esporoquistes de *Labratrema minimus*. NI, no infestado; IL&IM, infestaciones ligeras y moderadas; IA, infestación avanzada. El número que aparece sobre cada barra corresponde al número de individuos integrantes de cada categoría sexual.

#### IX.4.7. Ciclo gonadal y dinámica temporal de la enfermedad de los FGIHI.

El estudio de la dinámica temporal de desarrollo de FGIHI en relación al ciclo de desarrollo gonadal de berberecho se abordó en dos bancos distintos: en *Carril*, entre noviembre de 1999 y noviembre de 2000; y en *Sarrido*, entre octubre de 2001 y diciembre de 2002. En la Figura IX.9 se aprecia el patrón de variación temporal de la prevalencia mensual de la enfermedad de los FGIHI y el índice gonadal en ambas poblaciones. No se observó ninguna asociación evidente en el patrón de variación de ambas variables en ninguna de las dos poblaciones estudiadas.



**Figura IX.9:** Evolución temporal del índice gonadal y la prevalencia de FGIHI en los bancos de berberecho de *Carril* (A) y *Sarrido* (B).

#### IX.4.8. Efectos de la enfermedad de los FGIHI en el desarrollo gonadal

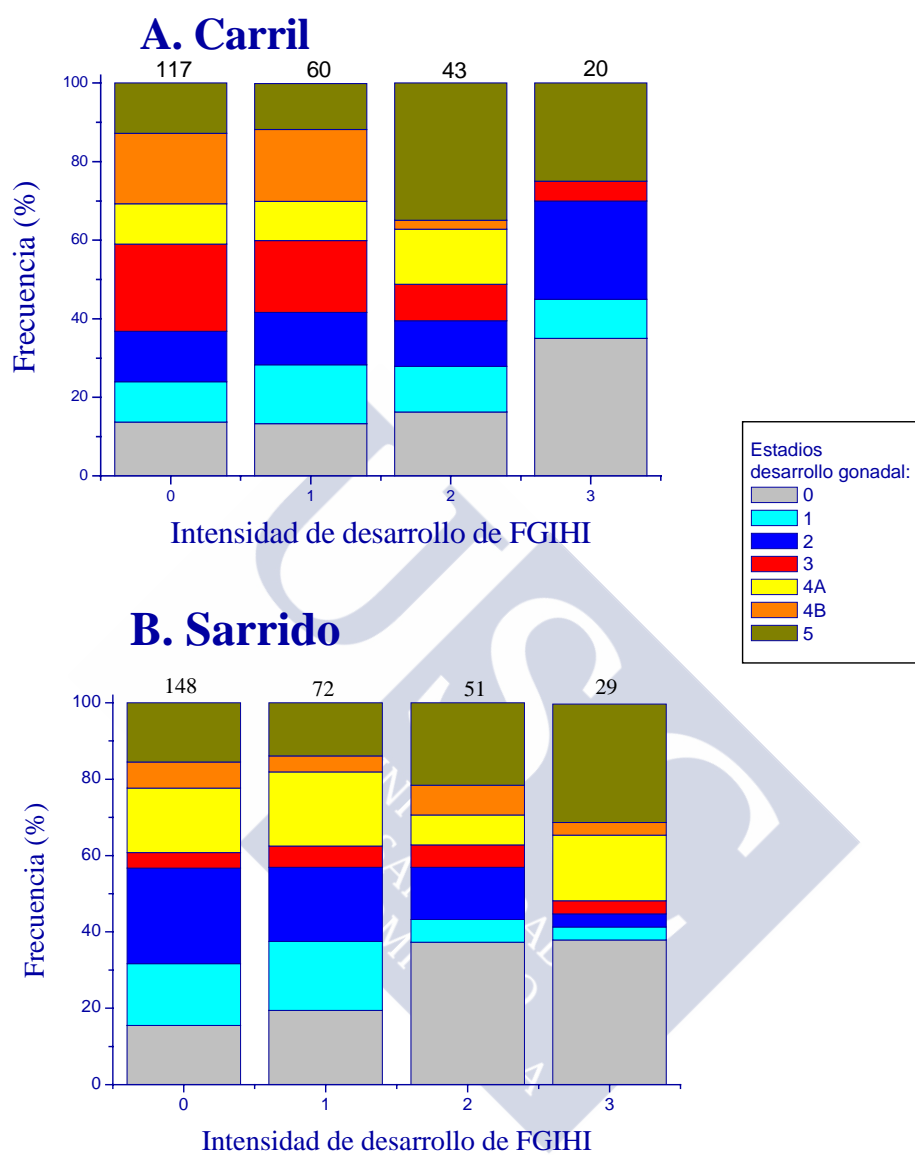
En la Figura IX.10 se representa la distribución de los berberechos de cada población estudiada, *Carril* (A) y *Sarrido* (B), según los estadios de desarrollo gonadal y las distintas clases de intensidad de desarrollo de FGIHI. Asimismo la Tabla IX.5 muestra los resultados de las pruebas estadísticas realizadas para evaluar si existían diferencias en los estadios de desarrollo gonadal entre las diferentes categorías de intensidad de FGIHI.

**Tabla IX.5:** Resultados de pruebas  $\chi^2$  realizadas para analizar las diferencias en condición gonadal entre clases de intensidad de desarrollo de FGIHI. *n.c.*=cálculo no realizado por falta de individuos suficientes en todas las categorías; *n.s.*= $P>0.05$ : valor de  $\chi^2$  no significativo; \*= $0,05>P>0,01$ ; \*\*= $0,01>P>0,001$ ; \*\*\*= $P<0,001$

ZONA	CATEGORÍAS DE INTENSIDAD	N	G.L.	Chi-cuadrado	P	
CARRIL	0 vs 1 vs 2 vs 3	240	18	35,687	0,008	**
	0 vs 1	177	6	1,099	0,982	<i>n.s.</i>
	0 vs 2	160	6	17,166	0,009	**
	0 vs 3	137	6	16,310	0,012	*
	1 vs 2	103	6	13,986	0,030	*
	1 vs 3	80	6	14,507	0,024	*
	2 vs 3 <sup>(1)</sup>	63	4	7,179	0,127	<i>n.s.</i>
SARRIDO	0 vs 1 vs 2 vs 3	300	18	33,435	0,015	*
	0 vs 1	220	6	2,237	0,897	<i>n.s.</i>
	0 vs 2	199	6	16,922	0,010	**
	0 vs 3	177	6	18,045	0,006	**
	1 vs 2	123	6	11,994	0,062	*
	1 vs 3	101	6	13,095	0,042	*
	2 vs 3	80	6	5,079	0,534	<i>n.s.</i>

(1) Para que el cálculo del estadístico *chi-cuadrado* fuese posible se procedió a la acumulación de las categorías 3 y 4B de desarrollo gonadal en una sola.

Los resultados en ambos bancos son muy similares, no detectándose diferencias significativas en la condición gonadal entre los individuos que no presentan FGIHI y aquellos con una intensidad ligera; ni entre aquellos integrantes de las categorías de intensidad moderada e intensa. Sí resultan significativas las diferencias en la condición gonadal entre el resto de categorías. Así en las figuras IX.10-A y B se observa una tendencia al alza en los estadios de reabsorción y reposo gonadal conforme incrementa la intensidad de desarrollo de FGIHI, y la tendencia inversa en aquellos estadios gonadales de progresión en el desarrollo gametogénico.



**Figura IX.10:** Distribución de los berberechos de acuerdo con el estadio de desarrollo gonadal y la intensidad de desarrollo de FGIHI. El número indicado en la zona superior de cada barra se refiere al número de individuos que integran cada categoría de intensidad.

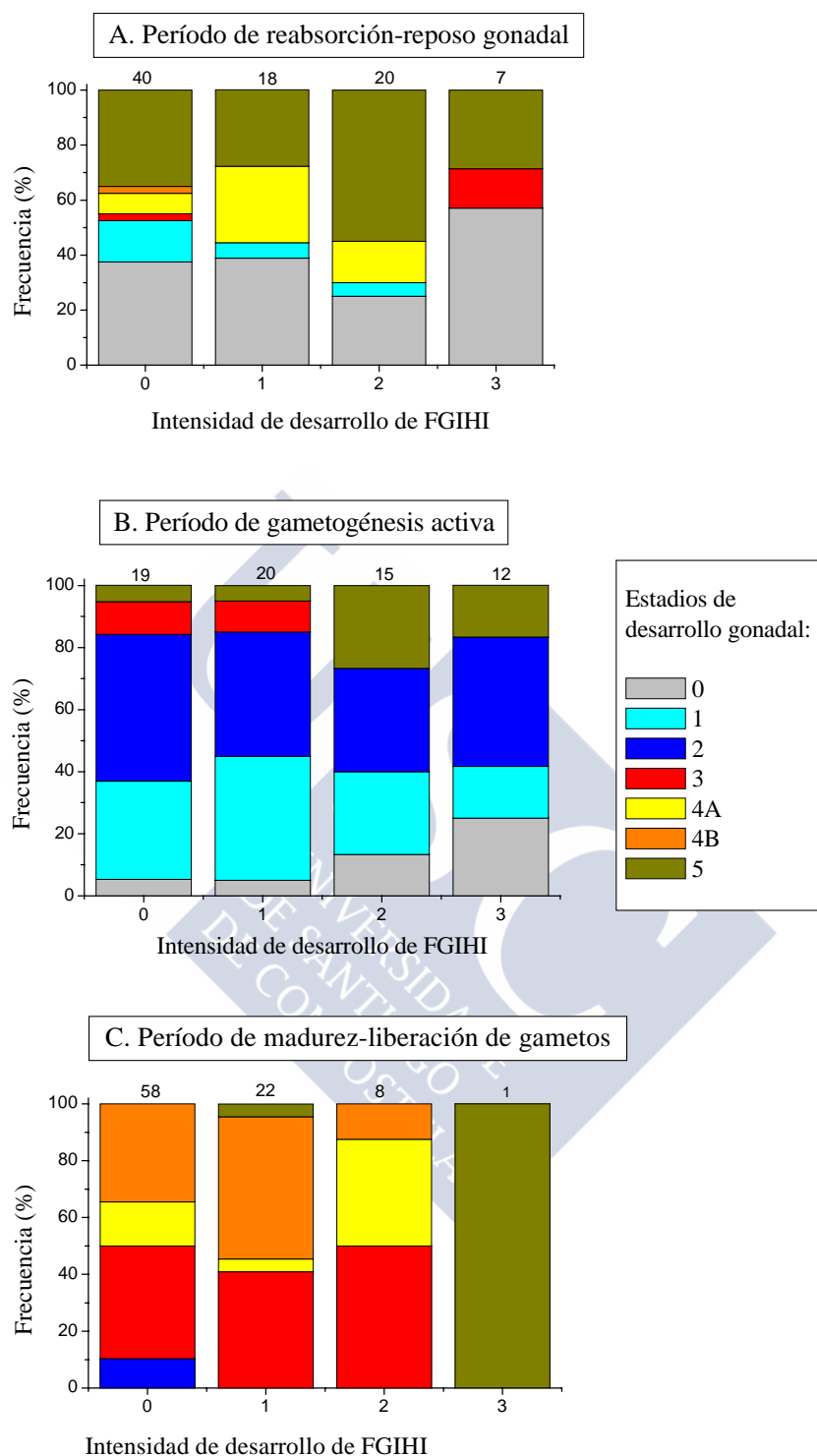


También en este caso se particularizó el estudio del efecto de los FGIHI sobre la condición gonadal en diferentes períodos del año, tanto para *Carril* (Figura IX.11) como para *Sarrido* (Figura IX.12), y así se distinguieron tres etapas conforme a los estadios de desarrollo gonadal más prevalentes:

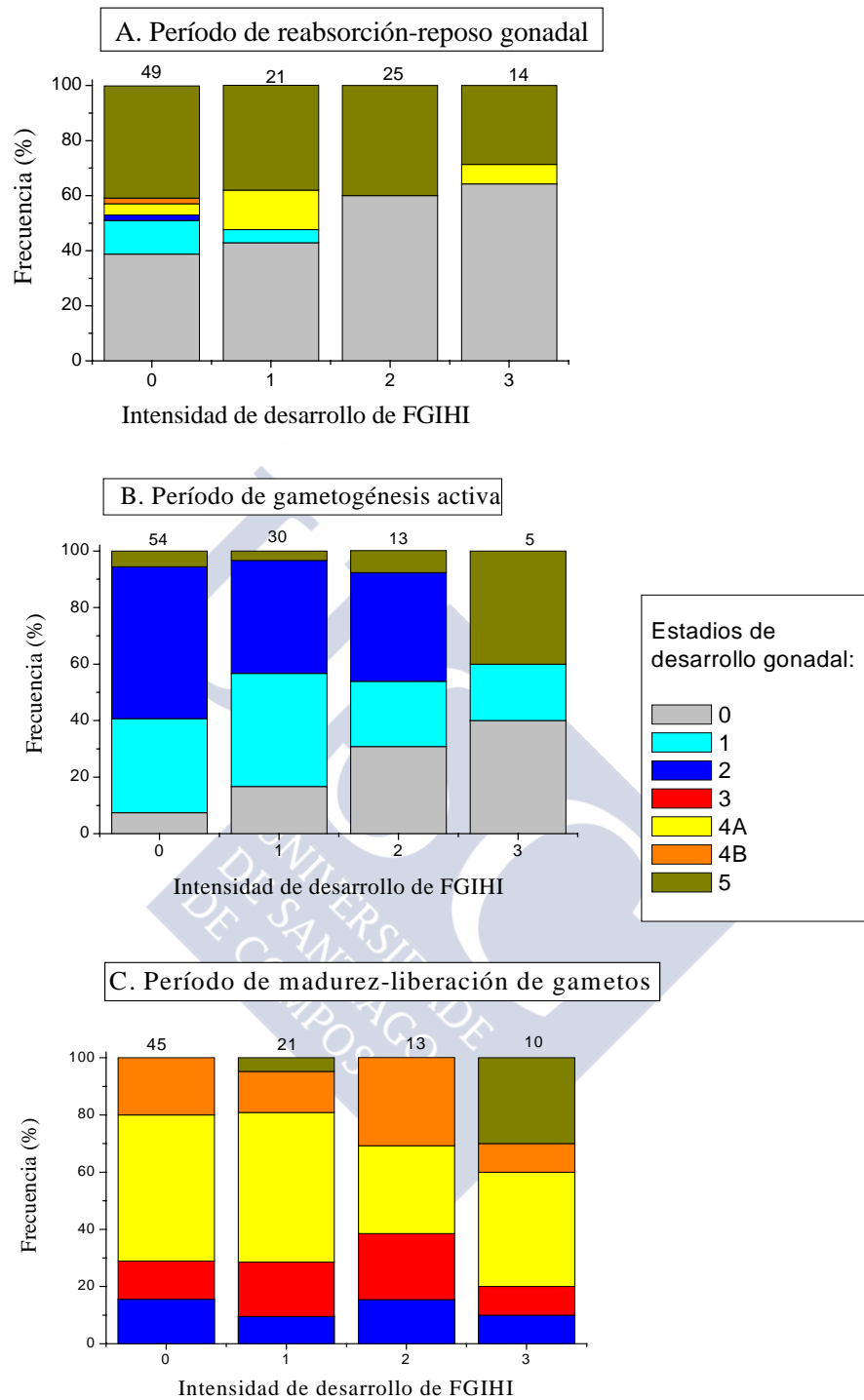
- Período de **reabsorción y reposo gonadal**, que incluyó los meses de julio, agosto, octubre y noviembre de 2000, para el caso de *Carril*; y octubre de 2001, agosto, septiembre, octubre, noviembre y diciembre de 2002, en *Sarrido*.
- Período de **gametogénesis activa**. Propio de los meses de noviembre de 1999, enero y febrero de 2000, en *Carril*; y noviembre de 2001, enero, febrero y marzo de 2002, en *Sarrido*.
- Período de **maduración y liberación de gametos**. Comprendió los meses de marzo, abril, mayo y junio de 2000, en *Carril*; y abril, mayo, junio y julio de 2002 en *Sarrido*.

El número de individuos en cada categoría no fue suficiente en ningún caso para la aplicación de pruebas  $\chi^2$  a las tablas de contingencia de cada período. De todos modos de la observación de las gráficas pueden inferirse ciertas tendencias en la evolución de la condición gonadal en los diferentes períodos de estudio.

En el período de reabsorción y reposo gonadal se observó un claro aumento en el porcentaje de individuos con su gónada en reposo en la categoría de mayor intensidad de desarrollo de FGIHI (3), al unísono con una disminución en el porcentaje de individuos con su gónada en estadios más activos, tanto en *Carril* como en *Sarrido* (Fig. IX.11-A y IX.12-A). Exactamente la misma tendencia fue observada en el caso de la etapa de gametogénesis activa de ambos bancos (Fig. IX.11-B y IX.12-B), incrementándose también el porcentaje de individuos con su gónada en reabsorción – además de en reposo – en las categorías de mayor intensidad de desarrollo de la enfermedad (2 y 3). En el período de maduración y liberación de gametos se observó un incremento en la fracción de individuos de la población con su gónada en reabsorción cuando éstos presentaban una intensidad de desarrollo de FGIHI máxima (3) (Fig. IX.11-C, IX.12-C).



**Figura IX.11:** Distribución de los berberechos del banco de *Carril* de acuerdo con el estadio de desarrollo gonadal y la intensidad de desarrollo de FGIHI en tres períodos distintos.



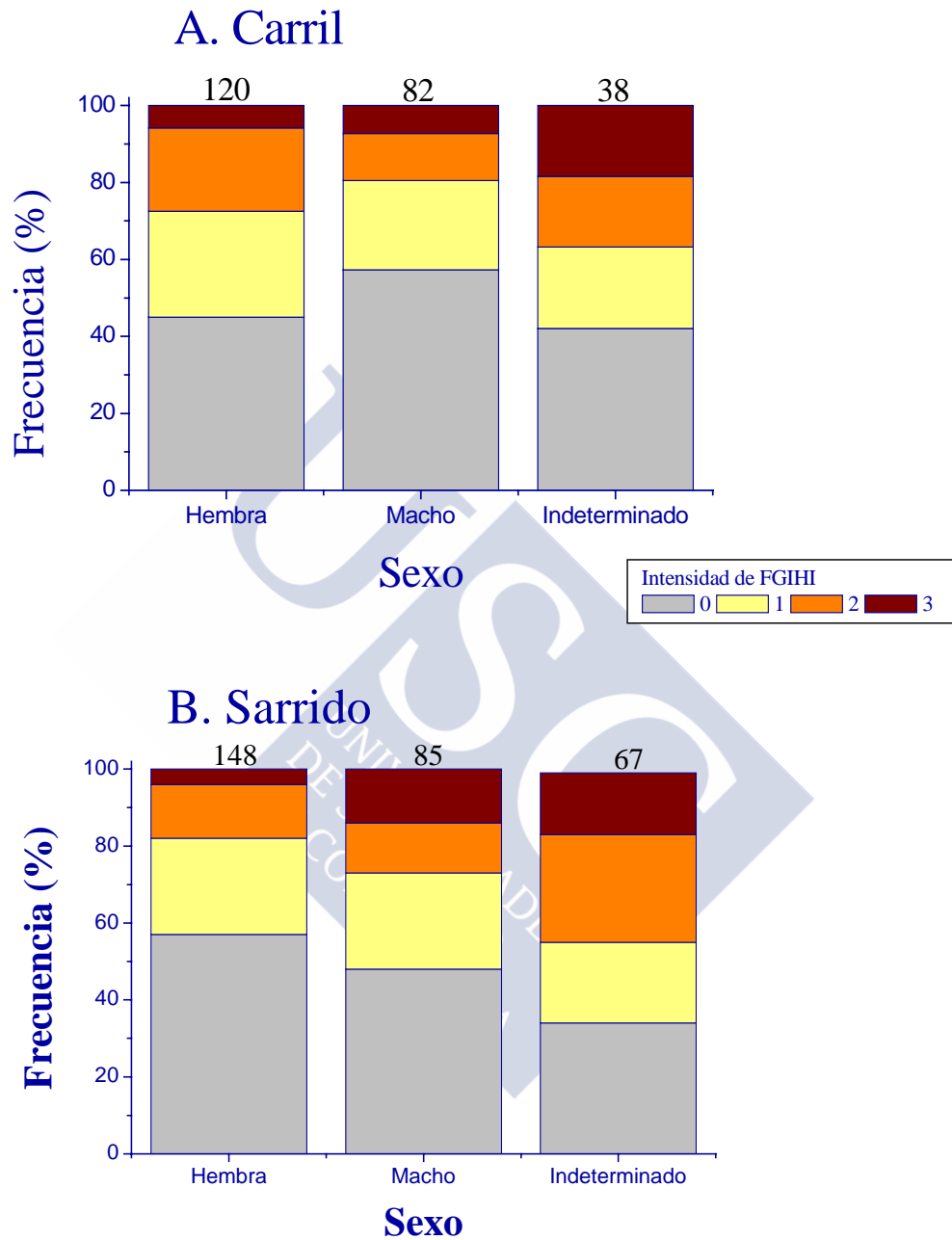
**Figura IX.12:** Distribución de los berberechos del banco de *Sarrido* de acuerdo con el estadio de desarrollo gonadal y la intensidad de desarrollo de FGIHI en tres períodos distintos.

#### IX.4.9. Asociación entre la enfermedad de los FGIHI y el sexo

El resultado del análisis de la asociación entre el sexo y la intensidad de la enfermedad de los FGIHI fue distinto para el caso de *Carril* y de *Sarrido* (Tabla IX.6; Figura IX.13). En el primer caso no se encontró una asociación significativa entre ninguna de las categorías de clasificación conforme al sexo y los distintos niveles de intensidad de FGIHI ( $\chi^2=10,659$ , GL=6, P=0,100). En *Sarrido* no se detectaron diferencias en el porcentaje de individuos pertenecientes a cada categoría de intensidad de la enfermedad entre machos e individuos de sexo indeterminado ( $\chi^2=6,600$ , GL=3, P=0,086); sin embargo, la prueba *chi-cuadrado* resultó significativa en lo que respecta a la comparación de hembras y machos, si bien muy ajustada al límite de significación ( $\chi^2= 7,872$ , GL=3, P= 0,049). La diferencia fue clara entre las hembras y los individuos de sexo indeterminado ( $\chi^2=18,883$ , GL=3, P=0,000). Del estudio de las diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas, se puede concretar que las diferencias entre las hembras y los machos se debió a que estos últimos aparecían en mayor proporción afectados con el nivel máximo (3) de intensidad de desarrollo de FGIHI. En cuanto a la diferencia entre hembras e individuos indeterminados, ésta radicaba en la distribución de individuos tanto en el nivel medio de intensidad (2) como en el máximo (3). Parece por tanto que en el banco de *Sarrido* los machos e individuos de sexo indeterminado presentaban porcentajes mayores de niveles máximos de intensidad de FGIHI que las hembras.

**Tabla IX.6:** Resultados de pruebas de  $\chi^2$  realizadas para analizar las diferencias en la intensidad de desarrollo de FGIHI entre sexos. *n.c.*=cálculo no realizado por falta de individuos suficientes en todas las categorías; *n.s.*=P>0,05: valor de  $\chi^2$  no significativo; \*=0,05>P>0,01; \*\*=0,01>P>0,001; \*\*\*=P<0,001

ZONA	SEXO	N	G.L.	Chi-cuadrado	P
CARRIL	Hembras vs Machos vs Indeterminados	240	6	10,659	0,100 <i>n.s.</i>
	Hembras vs Machos	202	3	4,451	0,217 <i>n.s.</i>
	Hembras vs Indeterminados	120	3	4,862	0,182 <i>n.s.</i>
	Machos vs Indeterminados	158	3	5,823	0,121 <i>n.s.</i>
SARRIDO	Hembras vs Machos vs Indeterminados	300	6	21,400	0,002 **
	Hembras vs Machos	233	3	7,872	0,049 *
	Hembras vs Indeterminados	215	3	18,883	0,000 ***
	Machos vs Indeterminados	152	3	6,600	0,086 <i>n.s.</i>



**Figura IX.13:** Distribución de los berberechos en función del sexo y la intensidad de desarrollo de FGIHI. El número indicado sobre cada columna corresponde al total de berberechos en cada categoría sexual.

## IX.5. DISCUSIÓN

La asociación entre el desarrollo de cada enfermedad y el ciclo gonadal del berberecho se abordó desde diferentes perspectivas: la primera referida a la posible influencia del estado de desarrollo gonadal en la susceptibilidad del bivalvo a la enfermedad; la segunda, a si la enfermedad tenía efectos en el desarrollo gonadal; y, por último, si la susceptibilidad y el desarrollo de la enfermedad eran función del sexo del bivalvo. En estudios de seguimiento de poblaciones en el medio natural es muy complicado, cuando no imposible, el establecimiento de relaciones causa-efecto y para ello se debería recurrir a experiencias desarrolladas en condiciones controladas. Esta observación es pertinente en el sentido de que la existencia de asociación entre dos procesos (ciclo gametogénico y desarrollo de una patología) no determina cuál es el que influye en el otro. Atendiendo, sin embargo, a la caracterización que de las patologías se ha realizado en los capítulos anteriores –en el aspecto de su dinámica de proliferación y efectos patogénicos en el berberecho- es posible discutir qué fenómenos se refieren a efectos del ciclo reproductor sobre la dinámica de la enfermedad y cuáles a efectos de la patología en cuestión sobre el ciclo de desarrollo gametogénico.

En el estudio realizado en *Misela* sobre la dinámica de neoplasia diseminada (capítulo V) se apreció un patrón estacional en la prevalencia de la enfermedad. La presencia de patrones estacionales en el desarrollo de una patología normalmente indican que ésta está influida por factores que varían de manera estacional. En el apartado correspondiente (sección V.5) se discutió acerca de la posible influencia de diferentes factores de estrés, relacionados con factores ambientales, en el desarrollo de la neoplasia. Los resultados expuestos en este capítulo confirman la existencia de asociación temporal entre el aumento de la prevalencia de la neoplasia diseminada a finales de verano y una disminución brusca del índice gonadal debido a la liberación de los gametos de forma masiva. Los fenómenos reproductivos asociados a la síntesis de gametos y a la puesta están reconocidos como importantes factores de estrés en moluscos bivalvos puesto que implican un gasto de energía muy grande. Esta asociación puede estar indicando que la puesta constituye un factor de estrés que origina un aumento de la prevalencia de la neoplasia debido a que nuevos individuos contraen la enfermedad. Balouet *et al.* (1986) describen en ostra plana *Ostrea edulis* de la Bretaña francesa un incremento en la prevalencia de una neoplasia diseminada hemocitaria coincidiendo con el período de puesta. Twomey y Mulcahy (1988a) argumentan que los picos estacionales de neoplasia diseminada, que observan en berberechos del sur de



Irlanda, pueden deberse a que el estrés post-puesta hace que los individuos sean más susceptibles a la enfermedad. Ford *et al.* (1997) describen en individuos juveniles de *Crassostrea virginica*, correspondientes a un año extraordinario de reclutamiento muy elevado, un patrón de incidencia de neoplasia diseminada que alcanza valores máximos en coincidencia con períodos de puesta. Estos autores sugieren que el estrés asociado a la puesta, las temperaturas relativamente elevadas y la elevada densidad de ostras registrada podrían ser responsables del desarrollo de la neoplasia.

Con respecto al impacto de la neoplasia en el desarrollo gametogénico, ya Farley (1969a) destacaba que la gametogénesis en mejillones *Mytilus edulis* de Yaquina Bay, Oregon, se detenía en individuos afectados por niveles “extensivos” de diseminación de células atípicas, mientras que en mejillones con lesiones localizadas la gametogénesis no resultaba afectada. Cosson-Mannevy *et al.* (1984), por el contrario, no encuentran un efecto claro de la neoplasia sobre el desarrollo gonadal de *Mytilus edulis* de Vancouver, Canadá. Elston *et al.* (1992) describen neoplasia asociada con un retraso de la gametogénesis, en *Mytilus edulis* de la costa oeste de los Estados Unidos, durante períodos de bajo suministro de alimento en el medioambiente pero no durante momentos de alimento abundante. Esto sugiere que el reparto energético favorece a las células neoplásicas sobre los gametos cuando el alimento es un factor limitante. Sunila (1991) apunta que las elevadas tasas respiratorias de las células tumorales mitóticamente activas podrían desviar energía de la ovogénesis. En el caso de la población de berberecho de *Misela*, afectada por neoplasia diseminada, el efecto de ésta fue claramente apreciable en los individuos que presentaban un nivel máximo de desarrollo de la neoplasia (infección sistémica) con respecto a aquellos libres de la enfermedad. En el período del ciclo gonadal de reabsorción de gametos y reposo, y en el caracterizado por una gametogénesis activa, se apreció que la totalidad de los individuos de la población que presentaban los niveles más elevados de intensidad de neoplasia tenían su gónada o bien en reposo, o bien en reabsorción. En el caso del período de madurez y puesta, se apreció que un cierto porcentaje de individuos, afectados por neoplasia a niveles elevados, aparecían con su gónada en reabsorción pero había un porcentaje grande de berberechos que conservaban su actividad gonadal. Teniendo en cuenta que el período de madurez y puesta correspondió, tal y como se expuso en el capítulo VIII, con concentraciones elevadas de clorofila *a* en el medio, el alimento en este período no resultó un factor limitante y se confirman para berberecho las observaciones de Elston *et al.* (1992) en mejillones *Mytilus edulis*.

La neoplasia diseminada (como ya se comentó en el capítulo IV) se caracteriza por la proliferación de células inusuales en el tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y senos de la masa visceral, músculo y manto (Peters 1988). La proporción de células anormales en los bivalvos afectados generalmente aumenta con el tiempo y resultan en la muerte del organismo (Cooper *et al.* 1982b; Barber 1990; Brousseau & Baglivo 1991a, b; Barber 1996). Cuando la infección se hace sistémica, prácticamente la totalidad del tejido conjuntivo en la periferia de los diferentes órganos del individuo aparece colonizado por células neoplásicas. En muchos casos se produce una deformación de la arquitectura normal de los órganos, incluida la gónada, lo que puede incluso originar que no aparezca prácticamente traza alguna de los folículos gonadales. Las células de neoplasia diseminada de *Mya arenaria* producen proteínas que, además de promover el crecimiento tumoral, podrían ser citotóxicas (Sunila 1992), inhibiendo posiblemente el desarrollo de los ovocitos.

Se ha encontrado que la neoplasia diseminada en la población de *C. edule* estudiada afecta por igual a machos y hembras, siendo significativamente mayor el porcentaje de individuos afectados por la neoplasia entre aquellos de sexo indeterminado. Teniendo en cuenta que el rango de tallas de los individuos estudiados era similar y correspondiente a la categoría de adultos, se puede apuntar como muy probable que los casos de indeterminación sexual se deban a los efectos de la patología sobre el organismo, provocando castración total. Según el momento en que la neoplasia diseminada se instaurase en el organismo y según el ritmo de propagación de la misma, podría darse una situación de inhibición total del desarrollo de los productos sexuales – en aras de la propagación tumoral- y por tanto una indefinición sexual. Brown *et al.* (1979) examinan la relación existente entre sexo y susceptibilidad a neoplasia en *Mya arenaria* sin encontrar diferencias significativas entre machos y hembras. Cosson-Mannevy *et al.* (1984) tampoco encuentran asociación alguna entre la caracterización sexual y la susceptibilidad a una neoplasia hemocitaria de *Mytilus edulis*. Twomey y Mulcahy (1988a) establecen para una neoplasia diseminada en berberechos de Irlanda una mayor incidencia en hembras que en machos, si bien la diferencia se situó muy cerca del límite de significación estadística. Brousseau y Baglivo (1994) encuentran para tres poblaciones distintas de *Mya arenaria* una menor incidencia de neoplasia diseminada en hembras que en machos. Potts (1996) no encuentra diferencias entre machos y hembras en la prevalencia de una neoplasia hemocitaria que afecta a *Mya arenaria* de Chesapeake Bay.

La existencia de asociación entre la prevalencia de parasitación por *Labratrema minimus* y el ciclo reproductivo del berberecho se estudió en los bancos de *Villabril*, *Misela* y *Lombos do Ulla*. En el caso de *Villabril* y *Lombos do Ulla* no se observó asociación entre el patrón de variación mensual del índice gonadal y la prevalencia de parasitación para ambas poblaciones. Sin embargo, en el caso de *Misela* se observó un patrón de dinámica de la parasitación caracterizado por presentar, durante dos años consecutivos, los máximos de prevalencia de parasitación de manera coincidente con los eventos de puesta de mayor intensidad. Este hecho coincide con las observaciones de Bowers (1969) en berberechos del sur de Gales, y parece indicar que la puesta constituye –al igual que ocurría con la neoplasia- un factor de estrés que incrementa la susceptibilidad de los berberechos, si bien cabe destacar que, tal y como se describió en el capítulo VI, existió correlación positiva significativa entre la prevalencia de *L. minimus* y la temperatura. Puesto que tanto el ciclo gonadal como la dinámica de la parasitación pueden estar asociados con la temperatura no se puede establecer una relación causa-efecto, ya que la asociación puede derivar de la influencia de un factor común.

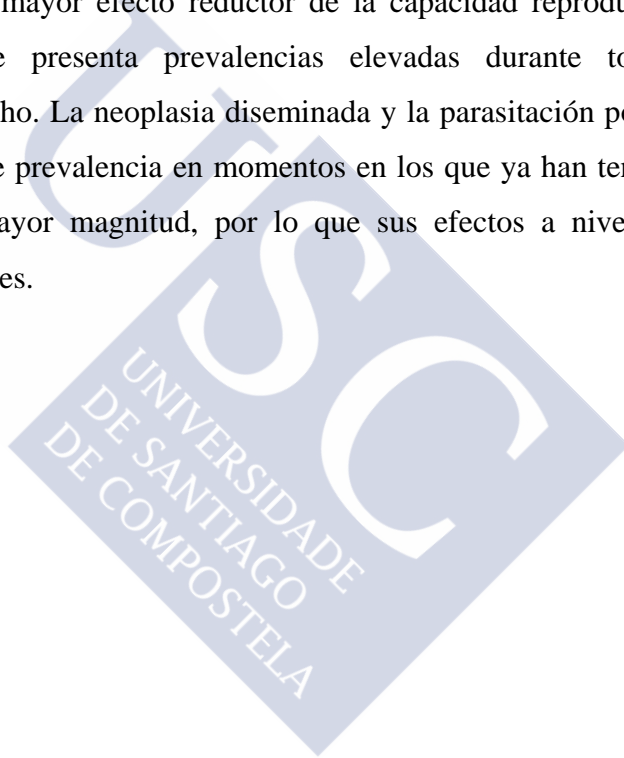
En cuanto al impacto del parasitismo por esporoquistes de *Labratrema minimus* sobre el desarrollo gametogénico, éste se estudió en la población de *Villabril*, y se manifestó de manera clara en el nivel máximo de infestación, incrementándose enormemente el porcentaje de individuos con su gónada en reposo. Este efecto fue apreciable a lo largo de todo el ciclo de desarrollo gametogénico y se trataba claramente del fenómeno de castración, lo cual quedó de manifiesto en el análisis de la asociación existente entre la intensidad de parasitación por esporoquistes de *L. minimus* y el sexo del hospedador. Mientras que no fue observada diferencia alguna en la intensidad de la parasitación entre machos y hembras (resultando igual, por tanto, la susceptibilidad de infestación en ambos sexos), sí se detectó una asociación positiva de la intensidad de parasitación con los individuos de sexo indeterminado. La castración por parásitos trematodos es un efecto ampliamente descrito (Lauckner 1983; capítulo VI de la presente memoria) que consiste en una inhibición directa del desarrollo gametogénico por invasión del tejido gonadal por parte de la fase de esporoquiste de dicho grupo de parásitos. El bloqueo de la gametogénesis beneficia al parásito debido a que las reservas del hospedador no se emplean para la progresión de la gametogénesis y quedan a disposición del trematodo (Coustau *et al.* 1993).

La existencia de asociación entre la enfermedad de los FGIHI y el ciclo gonadal del berberecho se estudió en los bancos de *Carril* y de *Sarrido* en años diferentes. No se observó asociación temporal entre el patrón de variación mensual del índice gonadal y la prevalencia de esta alteración, no pareciendo por tanto existir influencia del ciclo reproductivo en la susceptibilidad de los berberechos a esta enfermedad. En cuanto al impacto del desarrollo de FGIHI sobre el desarrollo gametogénico de *C. edule*, las observaciones a este respecto fueron coincidentes en ambos bancos y similares a los efectos de la neoplasia diseminada, con un incremento en el porcentaje de berberechos con su gónada en reposo y/o en reabsorción conforme la intensidad de la enfermedad de los FGIHI era mayor. Particularizando el estudio en las diferentes épocas del ciclo reproductor: en otoño, invierno e inicios de primavera se detectó una proporción menor de individuos con una condición gonadal caracterizada por estadios activos de desarrollo gonadal, así como un porcentaje mayor de berberechos con su gónada en reposo y reabsorción, entre aquellos que presentaban intensidades máximas de desarrollo de FGIHI. En la época de maduración y liberación de gametos (finales de primavera y verano) aumentó el porcentaje de berberechos con su gónada en reabsorción, especialmente en los niveles máximos de intensidad de la enfermedad. En cuanto al mecanismo de inducción de este efecto es del todo desconocido, incrementándose la incertidumbre al no haberse podido determinar por el momento la etiología de esta alteración patológica.

Con respecto a la intensidad de desarrollo de la enfermedad de los FGIHI en función del sexo de los berberechos, los resultados fueron ligeramente diferentes entre la población de *Carril* y *Sarrido*. En el primer caso no se detectó asociación entre los distintos niveles de intensidad y el sexo. En *Sarrido*, sin embargo, sí se detectó asociación entre la intensidad de desarrollo de FGIHI y el sexo, de forma que, aún cuando el porcentaje de individuos enfermos era igual entre machos y hembras, éstas presentaron porcentajes significativamente menores de niveles máximos de intensidad de FGIHI que los grupos de sexo masculino e indeterminado. Esta observación parece indicar que los machos son más sensibles a la enfermedad, en el aspecto de que ésta progresa en ellos más rápido, sufriendo, en consecuencia, castración y pasando a ser individuos indeterminados. De esta forma la mayor parte de los individuos indeterminados afectados por la enfermedad serían machos, hipótesis que resulta refrendada por el hecho de que, si se consideran estos individuos de sexo indeterminado afectados como machos, entonces la relación macho:hembra de la población se ajusta a

la relación de sexos 1:1 descrita en todas las poblaciones de berberecho estudiadas en el capítulo VIII.

El berberecho es una especie cuyo ciclo vital se caracteriza por un tamaño de población muy variable y mortalidades elevadas dependientes de eventos ambientales impredecibles. El desarrollo de poblaciones importantes depende en gran parte del éxito reproductivo. A la vista de los efectos descritos en el presente capítulo, y atendiendo a las prevalencias medias elevadas de estas patologías en algunos bancos de las rías gallegas (capítulo III), es previsible que exista un efecto reductor en el potencial reproductor a nivel poblacional. Considerando la dinámica de la prevalencia de las tres patologías estudiadas, es previsible que la enfermedad de los FGIHI sea la alteración patológica que ejerza el mayor efecto reductor de la capacidad reproductora a nivel poblacional, puesto que presenta prevalencias elevadas durante todo el ciclo reproductivo del berberecho. La neoplasia diseminada y la parasitación por *L. minimus* presentan los máximos de prevalencia en momentos en los que ya han tenido lugar los eventos de puesta de mayor magnitud, por lo que sus efectos a nivel poblacional probablemente son menores.







## **X. CONCLUSIONES**

---





## X. CONCLUSIONES

1. Las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* (L.) de la costa de Galicia son hospedadoras de organismos de naturaleza vírica, bacteriana, protistas y metazoos. Las enfermedades más patogénicas detectadas fueron: neoplasia diseminada, infestación por trematodos digeneos, desarrollo de focos grandes de infiltración hemocitaria intensa e infección por haplosporidios. El resto de organismos descritos pueden considerarse como especies simbioses asociadas al berberecho de la costa gallega, pudiendo ejercer efectos patogénicos únicamente si alcanzan una intensidad elevada y/o si el hospedador se encuentra sometido a otros factores de estrés.
2. La técnica de diagnóstico de neoplasia diseminada basada en la adhesión de hemocitos a portaobjetos tratados con poli-L-lisina fue la más sensible de las ensayadas, sin embargo, se recomienda su uso combinado con técnicas histológicas con el fin de obtener información complementaria en el contexto de los tejidos del organismo.
3. En el período estudiado se ha encontrado un patrón temporal de dinámica de la neoplasia diseminada cíclico y bimodal, con dos máximos anuales de prevalencia en la transición primavera-verano y otoño-invierno, y valores menores durante el invierno y al final del verano; resulta, sin embargo, necesario ampliar el período de estudio para confirmarlo.
4. Se han logrado aislar *in vivo* e identificar 6 especies diferentes de trematodos afectando a las poblaciones gallegas de berberecho: *Labratrema minimus* (Bucephalidae), *Meiogymnophallus minutus*, *M. fossarum* (Gymnophallidae) y 3 especies diferentes de *Himasthla* sp. (Echinostomatidae). En histología se han observado además fases larvarias de al menos 4 especies diferentes, probablemente: *Monorchis parvus* (Monorchidae), *Gymnophallus choledochus* (Gymnophallidae), *Psilostomum brevicolle* (Psilostomatidae) y *Renicola roscovita* (Renicolidae).

5. En berberechos afectados por la enfermedad de los FGIHI se detectaron células fagocitadas no determinadas en el interior de los focos y partículas asociadas de tipo vírico probablemente pertenecientes a Picornaviridae.
6. Los berberechos con intensidades altas de FGIHI presentaron índices de condición fisiológica menores que los berberechos sanos.
7. La prevalencia de neoplasia diseminada, esporoquistes de *Labratrema minimus* y de la enfermedad de los FGIHI fue significativamente mayor entre berberechos adultos de talla comercial que en juveniles.
8. Se ha caracterizado el ciclo gonadal de tres bancos de berberecho de las *Rías Baixas*. El inicio de la gametogénesis tuvo lugar en otoño, progresó durante el invierno y la máxima madurez gonadal se alcanzó en la transición invierno-primavera. Al inicio de la primavera se produjo una primera puesta, seguida de restauración gonadal y una nueva puesta a finales de primavera-inicio de verano. La reabsorción gonadal fue dominante a mediados de verano y a principios de otoño la gónada se encontraba en reposo. Se detectó un patrón diferente en un banco situado en las *Rías Altas*, donde la madurez no se alcanzaba hasta mediados de primavera y por tanto no tenía lugar la puesta de primavera temprana.
9. Los berberechos afectados por intensidades elevadas de las tres alteraciones presentaron una menor proporción de estadios gonadales de gametogénesis y madurez, lo que supone una disminución significativa de la capacidad reproductora del berberecho.
10. La intensidad de la parasitación fue independiente del sexo en el caso de neoplasia diseminada y parasitación por *L. minimus*. En el caso del desarrollo de FGIHI los berberechos machos presentaron intensidades mayores de la enfermedad que las hembras.

## **XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---







## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderman, D.J., Van Banning, P., Pérez-Colomer, A. 1977. Two European oyster (*Ostrea edulis*) mortalities associated with an abnormal haemocytic condition. *Aquaculture*, 10: 335-340.
- Alonso, A., Suarez, P., Alvarez, C., San Juan, F., Molist, P. 2001. Structural study of a possible neoplasia detected in *Mytilus galloprovincialis* collected from the Ría of Vigo (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 47: 73-79.
- Anderson, R.M. 1979. The influence of parasitic infection on the dynamics of host population growth. En: *Population Dynamics*. Anderson, R.M., Turner, B.D., Taylor, L.R. (Eds.). Blackwell, Oxford. pp. 245-281.
- Andrews, J.D. 1984. Epizootiology of diseases of oysters (*Crassostrea virginica*), and parasites of associated organisms in eastern North America. *Helgoländer Meeresunters*, 37: 149-166.
- Andrews, J.D., Hewatt, W.G. 1957. Oyster mortality in Virginia II. The fungus disease caused by *Dermocystidium marinum* in oysters of Chesapeake Bay. *Ecol. Monogr.*, 27: 1-25.
- Anónimo. 1991. Directiva 91/67/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura. *Diario Oficial* L 46: 1-18.
- Anónimo. 1994. Commission Decision 94/306/EC of May 1994 laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain mollusc diseases. *Off. J. Eur. Communities* L 133: 51-53.
- Appeldoorn, R.S., Brown, C.W., Brown, R.S., Chang, P.W., Cooper, K.R., Lorda, E., Saila, S., Walker, H., Wolke, R.E. 1984. Field and laboratory studies to define the occurrence of neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *American Petroleum Institute Publication 4345*. American Petroleum Institute, Washington, D.C.

- Auffret, M. 1989. Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the European Flat Oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Shellfish Research*, 8: 367-373.
- Auffret, M., Poder, M. 1986. Sarcomatous Lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. II. Electron Microscopical Study. *Aquaculture*, 58: 9-15.
- Azevedo, C., Canning, E.U. 1987. Ultrastructure of a microsporidian hyperparasite, *Unikaryon legeri* (Microsporida), of trematode larvae. *J. Parasit.*, 73: 214-223.
- Azevedo, C., Cachola, R. 1992. Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. *Dis. Aquat. Org.*, 14: 69-73.
- Azevedo, C., Conchas, R.F., Montes, J. 2003. Description of *Haplosporidium edule* n. sp. (Phylum *Haplosporidia*), a parasite of *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) with complex spore ornamentation. *Europ. J. Protistol.*, 39: 161-167.
- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 549-559.
- Balouet, G., Poder, M., Cahour, A., Auffret, M. 1986. Proliferative Hemocytic Condition in European Flat Oysters (*Ostrea edulis*) from Breton Coasts: A 6-Year Survey. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 208-215.
- Barber, B.J. 1990. Seasonal Prevalence and Intensity and Disease Progression of Neoplasia in Soft-Shell Clams, *Mya arenaria*, from The Shrewsbury River, New Jersey. En: Pathology in Marine Science. Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (Eds.). Academic Press, INC, Gloucester Point, Virginia. pp. 377-386.
- Barber, B.J. 1996. Effects of Gonadal Neoplasms on Oogenesis in Softshell Clams, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 161-168.
- Barber, B.J. 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquatic Living Resources*, 17: 449-466.

- Barber, B.J., Ford, S.E., Haskin, H.H. 1988. Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism. I. Condition Index and Relative Fecundity. *Journal of Shellfish Research*, 7: 25-31.
- Barber, B.J., Davis, C.V., Crosby, M.A. 1998. Cultured oysters, *Crassostrea virginica*, genetically selected for fast growth in the Damariscotta river, Mayne, are resistant to mortality caused by juvenile oyster disease (JOD). *Journal of Shellfish Research*, 17: 1171-1175.
- Barker, C.M., Calvert, R.J., Walker, C.W., Reinisch, C.L. 1997. Detection of Mutant p53 in Clam Leukemia Cells. *Experimental Cell Research*, 232: 240-245.
- Bartoli, P. 1965. Développement expérimental d'une métacercarie nouvelle de la famille des Gymnophallidae Morozov, 1955 (trematoda: Digenea), parasite de lamellibranches marins. *Bull. Soc. zool. Fr.*, 90: 571-580.
- Bartoli, B., Jousson, O., Russell-Pinto, F. 2000. The life cycle of *Monorchis parvus* (Digenea: Monorchidae) demonstrated by developmental and molecular data. *J. Parasitol.*, 86: 479-489.
- Bayne, B. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. En: *Estuarine processes*. Wiley, M. (Ed.) New York, Academic Press. pp. 432-448.
- Boussaid, B., Grippari, J.L., Renault, T., Tiges, G., Dorange, G. 1999. *Trichodina* sp. infestation of *Crassostrea gigas* oyster gills in Brittany, France. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 339-342.
- Bower, S.M. 1989. The summer mortality syndrome and haemocytic neoplasia in blue mussels (*Mytilus edulis*) from British Columbia. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1703: 65.
- Bower, S.M., Figueras, A.J. 1989 Infectious diseases of mussels, especially pertaining to mussel transplantation. *World Aquacult.*, 20: 89-93.
- Bower, S.M., Blackkbourn, J., Meyer, G.R. 1992. Parasite and symbiont fauna of Japanese littlenecks, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850), in British Columbia. *J. Shellfish Res.*, 11, 13-19.

- Bower, S.M., McGladdery, S.E., Price, I.M. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*, 4: 1-199.
- Bowers, E.A. 1969. *Cercaria bucephalopsis haimeana* (Lacaze-Duthiers, 1854) (Digenea: Bucephalidae) in the cockle, *Cardium edule* L. in South Wales. *J. nat. Hist.*, 3: 409-422.
- Bowers, E.A., James, B.L. 1967. Studies on the morphology, ecology and life-cycle of *Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859), comb. Nov. (Trematoda: Gymnophallidae). *Parasitology*, 57: 281-300.
- Bowers, E.A., Bartoli, P., Russell-Pinto, F., James, B.L. 1996. The metacercariae of sibling species of *Meiogymnophallus*, including *M. rebecqui* comb. nov. (Digenea: Gymnophallidae), and their effects on closely related Cerastoderma host species (Mollusca: Bivalvia). *Parasitol. Res.*, 82: 505-510.
- Boyden, C.R. 1971. A comparative study of the reproductive cycles of the cockles *Cerastoderma edule* and *C. glaucum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51: 605-622.
- Brancroft, J.D., Stevens, A. 1996. *Theory and Practice of Histological Techniques* (fourth ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Brooks, K.M., Elston, R.A. 1991. Epizootiology of hemic neoplasia in *Mytilus trossulus* within Washington State. II. *Journal of Shellfish Research*, 10: 233.
- Brousseau, D.J., Baglivo, J.A. 1991a. Disease progression and mortality in neoplastic *Mya arenaria* in the field. *Marine Biology*, 110: 249-252.
- Brousseau, D.J., Baglivo, J.A. 1991b. Field and laboratory comparisons of mortality in normal and neoplastic *Mya arenaria*. *Journal of Inv. Pathol.*, 57: 59-65.
- Brousseau, D.J., Baglivo, J.A. 1994. Notes on Epizootiological Aspects (Sex and Age) of Disseminated Neoplasia in *Mya arenaria* from Long Island Sound. *Journal of Inv. Pathol.*, 63: 214-216.

- Brown, R.S. 1980. The value of the multidisciplinary approach to research on marine pollution effects as evidenced in a three-year study to determine the etiology and pathogenesis of neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer*, 179: 125-128.
- Brown, R.S., Wolke, R.E., Saila, S.B. 1976. A preliminary report on neoplasia in feral populations of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*, prevalence, histopathology and diagnosis. En: *Proceedings of the First International Colloquium on Invertebrate Pathology*. Kingston, Ontario, Canadá. pp. 356-361.
- Brown, R.S., Wolke, R.E., Saila, S.B., Brown, C.W. 1977. Prevalence of neoplasia in 10 New England populations of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Ann. NY Acad. Sci.*, 298: 522-534.
- Brown, R.S., Wolke, R.E., Brown, C.W., Saila, S.B. 1979. Hydrocarbon pollution and the prevalence of neoplasia in New England soft-shell clams (*Mya arenaria*). En: *Animals as Monitors of Environmental Pollutants*. National Research Council, National Academic Press, Washington, D.C. pp. 41-51.
- Buchanan, J.T., Cheng, T.C., La Peyre, J.F., Cooper, R.K., Tiersch, T.R. 2001a. *In vivo* Transfection of Adult Eastern Oysters *Crassostrea virginica*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32: 286-299.
- Buchanan, J.T., Nickens, A.D., Cooper, R.K., Tiersch, T.R. 2001b. Transfection of Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Embryos. *Mar. Biotechnol.*, 3: 322-335.
- Cadoret, J-P., Gendreau, S., Delecheneau, J-M., Rousseau, C., Mialhe, E. 1997. Microinjection of bivalve eggs: application in genetics. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6: 72-77.
- Calvo-Ugarteburu, G., McQuaid, C.D. 1998a. Parasitism and invasive species: effects of digenetic trematodes on mussels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169: 149-163.
- Calvo-Ugarteburu, G., McQuaid, C.D. 1998b. Parasitism and introduced species: epidemiology of trematodes in the intertidal mussels *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220: 47-65.

- Canning, E.U., Nicholas, J.P. 1974. Light and electron microscope observations on *Unikaryon legeri* (Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the metacercaria of *Meiogymnophallus minutus* in *cardium edule*. *J. Invertebr. Path.*, 23: 92-100.
- Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., Villalba, A. 2001. Parasites and Pathologic Conditions of the Cockle *Cerastoderma edule* Populations of the Coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 87-97.
- Casas, S.M. 2001. Estudio de la perkinsosis en la almeja fina, *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758), de Galicia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Casas, S.M., Villalba, A. 2005. Effect of perkinsosis on the reproduction of the clam *Tapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research*, 24: 645.
- Casas, S.M., Villalba, A., Reece, K.S. 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, 50: 51-65.
- CES. 2001. Informe: Situación e perspectivas do sector do marisqueo a pé en Galicia. Consello Económico e Social de Galicia. *Colección Informes 2/01*. 148 pp.
- Chapman, H.D., Wilson, R.A. 1970. The distribution and fine structure of the integumentary papillae of the cercaria of *Himasthla secunda* (Nicoll). *Parasitology*, 61: 219-227.
- Cheng, T.C. 1967. Parasites of commercially important marine molluscs. En: *Advances in Marine Biology. Marine Mollusc as Host for Symbioses*. Accademic Press., New York, pp. 199-211.
- Cheng, T.C. 1981. Bivalves. En: *Invertebrate Blood Cells 1: General Aspects. Animals without True Circulatory Systems to Cephalopods*. Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (Eds.). Academic Press, London. pp. 233-300.



- Cheng, T.C. 1993. Noninfectious Diseases of Marine Molluscs. En: *Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*. Couch, J.A. & Fournie, J.W. (Eds.). CRC Press, pp. 289-318.
- Christensen, D.J., Farley, A., Kern, F.G. 1974. Epizootic Neoplasms in the clam *Macoma balthica* (L.) from Chesapeake Bay. *Journal of the National Cancer Institute*, 52: 1739-1749.
- Collins, C.M. 1998. Studies on a neoplasm of the cockle, *Cerastoderma edule* (Linnaeus). Tesis doctoral, National University of Ireland, Cork.
- Collins, C.M., Mulcahy, M.F. 2003. Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.*, 54: 61-67.
- Comps, M., Grizel, H., Tige, G., Duthoit, J-L. 1975. Pathologie des invertébrés - Parasites nouveaux de la glande digestive des Mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L. *C. R. Acad. Sc. Paris t.* 281: 179-181.
- Comps, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 18 : 23-37.
- Cooper, K.R. 1979. The Hematopoietic Neoplasm in the Commercially Important Bivalve Mollusks *Mya arenaria* (L.). Tesis doctoral. Universidad de Rhode Island.
- Cooper, K.R., Brown, R.S., Chang, P.W. 1982a. Accuracy of blood cytological screening techniques for the diagnosis of a possible hematopoietic neoplasm in the bivalve mollusc, *Mya arenaria*. *Journal of Inv. Pathol.*, 39: 281-289.
- Cooper, K.R., Brown, R.S., Chang, P.W. 1982b. The Course and Mortality of a Hematopoietic Neoplasm in the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. *Journal of Inv. Pathol.*, 39: 149-157.
- Cosson-Mannevy, M.A., Wong, C.S., Cretney, W.J. 1984. Putative neoplastic disorders in mussels (*Mytilus edulis*) from southern Vancouver Island waters, British Columbia. *Journal of Inv. Pathol.*, 44: 151-160.

- Coustau, C., Robbins, I., Delay, B., Renaud, F., Mathieus, M. 1993. The parasitic castration of the mussel *Mytilus edulis* by the trematode parasite *Proserhynchus squamatus*: specificity and partial characterization of endogenous and parasite-induced anti-mitotic activities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104 A: 229-233.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A., Mulcahy, M.F. 2004. Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture*, 237: 41-58.
- Cunningham, C.O. 2002. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture*, 206: 19-55.
- Da Ros, L., Canzonier, W.J. 1985. *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean Basin. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 5: 23-27.
- da Silva, P.M. 2005. Evaluación de la susceptibilidad a enfermedades, capacitación inmunológica y caracteres productivos en poblaciones de ostra plana *Ostrea edulis* de origen geográfico diverso. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- da Silva, P.M., Fuentes, J., Villalba, A. 2005a. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology*, 147: 965-977.
- da Silva, P.M., Soudant, P., Carballal, M.J., Lambert, C., Villalba, A. 2005b. Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.*, 67: 133-139.
- Davis, C.V., Barber, B.J. 1999. Growth and survival of selected lines of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) affected by juvenile oyster disease. *Aquaculture*, 178: 253-271.
- de Montaudouin, X., Wegeberg, A.M., Jensen, K.T., Sauriau, P.G. 1998. Infection characteristics of *Himasthla elongata* cercariae in cockles as a function of water current. *Dis. Aquat. Org.*, 34: 63-70.

- de Montaudouin, X., Kisielewski, I., Bachelet, G., Desclaux, C. 2000. A census of macroparasites in an intertidal community, Arcachon Bay, France. *Oceanologica Acta*, 23: 453-468.
- Deltreil J-P., His, E. 1970. Sur la présence d'une cercaire de trématode chez *Cardium edule* L. dans le bassin D'Arcachon. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 34: 225-232.
- Desclaux, C., de Montaudouin, X., Bachelet, G. 2002. Cockle emergence at the sediment surface: 'favourization' mechanism by digenean parasites? *Dis. Aquat. Org.*, 52: 137-149.
- Desclaux, C., de Mountaudouin, X., Bachelet, G. 2004. Cockle *Cerastoderma edule* population mortality: role of the digenean parasite *Himasthla quissetensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 279: 141-150.
- Desprez, M., Ducrotoy, J.P., Elkaim, B. 1987. Crise de la Production des Coques (*Cerastoderma edule*) en Baie de Somme. I. Synthèse des connaissances biologiques. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 49 (3 et 4): 215-230.
- Desser, S.S., Bower, S.M., Hong, H. 1998. *Pseudoklossia semiluna* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae): a coccidian parasite of the kidney of blue mussels, species of *Mytilus*, from British Columbia, Canada. *Parasite*, 5: 17-22.
- Díaz, S. 2005. Estudio de neoplasia diseminada y otras alteraciones patológicas y parásitos que afectan a las poblaciones de berberecho, *Cerastoderma edule*, de Galicia. Trabajo de investigación para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de Santiago de Compostela. 68 pp.
- Díaz, S., Soudant, P., da Silva, M., Carballal, M.J., Lambert, C., Villalba, A. 2005. Flow cytometric DNA content analyses of normal haemocytes and neoplastic cells in the haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. Abstracts of the EAEP 12<sup>th</sup> International Conference, Copenhagen: 207.
- Dopp, E., Barker, C.M., Schiffmann, D., Reinisch, C.L. 1996. Detection of micronuclei in hemocytes of *Mya arenaria*: association with leukemia and induction with an alkylating agent. *Aquatic Toxicology*, 34: 31-45.

- Ducrotoy, J.P., Desprez, M., Elkaim, B. 1987. Crise de la Production des Coques (*Cerastoderma edule*) en Baie de Somme. II. Impact de la dynamique biosédimentaire. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 49 (3 et 4): 231-241.
- Elston, R.A. 1986. An intranuclear pathogen [Nuclear Inclusion X (NIX)] associated with massive mortalities of the Pacific Razor Clam, *Siliqua patula*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 93-104.
- Elston, R.A. 1997. Special topic review: Bivalve mollusc viruses. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13: 393-403.
- Elston, R.A., Kent, M.L., Drum, A.S. 1988a. Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, 4: 135-142.
- Elston, R.A., Kent, M.L., Drum, A.S. 1988b. Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. *Developmental and Comparative Immunology*, 12: 719-727.
- Elston, R.A., Drum, A.S., Allen, S.K. Jr. 1990. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Dis. Aquat. Org.*, 8: 51-59.
- Elston, R.A., Moore, J.D., Brooks, K. 1992. Disseminated Neoplasia of Bivalve Molluscs. *Reviews in Aquatic Sciences*, 6: 405-466.
- Elston, R.A., Frelie, P., Cheney, D. 1998. Systemic Gregarine-like Protozoa in Juvenile Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793). *Journal of Shellfish Research*, 17: 1177-1181.
- Farley, C.A. 1969a. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *J. Natl. Cancer Inst.*, 43: 509-516.
- Farley, C.A. 1969b. Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 31: 541-555.
- Farley, C.A. 1976. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. *Prog. exp. Tumor Res.*, 20: 283-294.

- Farley, C.A. 1977. Neoplasms in estuarine mollusks and approaches to ascertain causes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 298: 225-232.
- Farley, C.A. 1986. Selected aspects of Neoplastic Progression in Mollusks. En: *Progressive stages of malignant growth/development. Vol. II. Part 4: Comparative aspects of tumour progression*. Kaiser, H.E. (Ed.). Oxford, Maryland. pp. 1-14.
- Farley, C.A. 1988. A computerized coding system for organs, tissues, lesions, and parasites of bivalve mollusks and its application in pollution monitoring with *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, 24: 243-249.
- Farley, C.A., Sparks, A.K. 1969. Proliferative diseases of hemocytes, endothelial cells, and connective tissue cells in mollusks. *Comp. Leukemia Res.*, 36: 610-617.
- Farley, C.A., Otto, S.V., Reinisch, C.L. 1986. New occurrence of epizootic sarcoma in Chesapeake Bay soft shell clams, *Mya arenaria*. *Fishery Bulletin*, 84: 851-857.
- Farley, C.A., Plutschak, D.L., Scott, R.F. 1991. Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma in Maryland soft shell clams, *Mya arenaria*, 1984-1988. *Environ. Health Perspect.*, 90: 35-41.
- Fernandez Castro, N., Guillou, J., Le Pennec, M., Cardenas Lopez, J.J. 1989. Le cycle sexuel de *Cerastoderma edule* L. (Bivalve: Cardiidae) a Brouennou (Finistere). *Haliotis*, 19: 325-334.
- Figueras, A.J. 1991. *Bonamia* status and its effects in culture flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, 93: 225-233.
- Figueras, A.J., Montes, J. 1988. Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *American Fisheries Society Special Publication*, 18: 38-46.
- Figueras, A., Robledo, J.A.F., Novoa, B. 1992. Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ria de Vigo (Galicia, NW Spain). *Journal of Shellfish Research*, 11: 377-382.

- Ford, S.E., Haskin, H.H. 1987. Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Parasitol.*, 73: 368-376.
- Ford, S.E., Figueras, A.J., Haskin, H.H. 1990. Influence of selective breeding, geographic origin, and disease on gametogenesis and sex ratios of oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Aquaculture*, 88: 285-301.
- Ford, S.E., Barber, R.D., Marks, E. 1997. Disseminated neoplasia in juvenile eastern oysters *Crassostrea virginica*, and its relationship to the reproductive cycle. *Dis. Aquat. Org.*, 28: 73-77.
- Friedman, C.S., Andree, K.B., Hedrick, R.P. 2000. Candidatus *Xenohaliotis californiensis*, a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the West Coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 847.
- Frierman, E.M., Andrews, J.D. 1976. Occurrence of hematopoietic neoplasms in Virginia oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Natl. Cancer Inst.*, 56: 319-322.
- García, A., Otero, J., De Coó, A., López, M.C., Carballal, M.J., Otero González, J. 1987. Contribución al estudio del berberecho (*Cerastoderma edule* L.) en la Ría de Arousa. *Cuad. Marisq. Pub. Téc.*, 11: 333-352.
- Gauthier, J.D., Soniat, T.M., Rogers, J.S. 1990. A parasitological survey of oysters along salinity gradients in coastal Louisiana. *J. World Aquacult. Soc.*, 21(2): 105-115.
- Gimazane, J.P. 1972 . Etude expérimentale de l'action de quelques facteurs externes sur la reprise de l'activité génitale de la Coque, *Cerastoderma edule* L., Mollusque bivalve. *Comptes rendus de Séances de la Société de Biologie et de ses filiales*, 166: 587-589.
- Gimazane, J.P. & Lubet, P. 1972a. Etude du cycle sexuel de la Coque (*Cerastoderma edule* L. = *Cardium edule* L.), Mollusque bivalve. *Comptes rendus de Séances de la Société de Biologie et de ses filiales*, 166: 590-592.



- Gimazane, J.P. & Lubet, P. 1972b. Étude expérimentale de l'action de la nutrition, de la température et de la lumière sur le cycle sexuel de *Cardium edule* L. (Mollusque bivalve). *Bulletin. Société linneenne de Normandie*, 103: 137-143.
- Goater, C.P. 1993. Population biology of *Meiogymnophallus minutus* (Trematoda: Gymnophallidae) in cockles from the Exe Estuary. *J. mar. biol. Ass. UK*, 73: 163-177.
- Gómez-Mourelle, S. 1993. Estudio patológico del mejillón cultivado en Galicia (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- González, R., Pérez Camacho, A. 1984a. El berberecho *Cerastoderma edule* (L.), de Carril (Ría de Arousa) I: Reproducción y estado de condición. *Actas do IV Simpósio Ibérico de Estudos do Benthos Marinho*, II: 209-222.
- González, R., Pérez Camacho, A. 1984b. El berberecho, *Cerastoderma edule* (L.) de Carril (Ría de Arousa) II: Reclutamiento, crecimiento, mortalidad natural y producción. *Actas do IV Simpósio Ibérico de Estudos do Benthos Marinho*, II: 223-244.
- González Herrero, V., Peñas Rodríguez, J., Díaz Martínez, A. 1987. Nematopsis en berberecho (*Cardium edule*). *Cuad. Marisq. Publ. Téc.*, 12: 701-706.
- Green, M., Alderman, D.J. 1983. Neoplasia in *Mytilus edulis* L. from United Kingdom waters. *Aquaculture*, 30: 1-10.
- Gueguen, Y., Cadoret, J-P., Flament, D., Barreau-Roumiguère, C., Girardot, A-L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E., Escoubas, J-M. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303: 139-145.
- Guillou, J., Bachelet, G., Desprez, M., Ducrotoy, J-P., Madani, I., Rybarczyk, H., Sauriau, P-G., Sylvand, B., Elkaim, B., & Glemarec, M., 1990. Les modalités de la reproduction de la coque (*Cerastoderma edule*) sur le littoral français de la Manche et de l'Atlantique. *Aquatic Living Resources*, 3: 29-41.

- Gulka, G., Chang, P.W. 1984. Pathogenicity and infectivity of a rickettsia-like organism in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Fish. Dis.*, 8: 309-318.
- Gutiérrez, M., Sarasquete, M.C. 1986. Un caso de hemocitosarcoma hialino en el mejillón, *Mytilus edulis* L. (Pelecypoda: Mytilidae) de la costa NO de España. *Inv. Pesq.*, 50: 265-269.
- Han, E-T., Han, K-Y., Chai, J-Y. 2003. Tegumental ultrastructure of the juvenile and adult *Himasthla alincia* (Digenea: Echinostomatidae). *The Korean Journal of Parasitology*, 41:17-25.
- Hancock, D.A., Urquhart, A.E. 1965. The determination of natural mortality and its causes in an exploited population of cockles (*Cardium edule* L.). *Fish. Invest. Lond.* (Ser. 2): 1-40.
- Haskin, H.H., Ford, S.E. 1979. Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware bay. *Mar. Fish. Rev.*, 41: 54-63.
- Haskin, H.H., Ford, S.E. 1987. Breeding for disease resistance in molluscs. En: *Proceedings of the World Symposium on Selection*. HaGEia (Ed.). Bordeaux, France. pp. 431-441.
- Heasman, M.P., O'Connor, W.A., Frazer, A.W. 1996. Digenean (Bucephallidae) infections in commercial scallops, *Pecten fumatus* Reeve, and doughboy scallops, *Chlamys* (Mimachlamys) *asperima* (Lamarck), in Jervis Bay, New South Wales. *Journal of Fish Diseases*, 19: 333-339.
- Hine, P.M., Wesney, B. 1997. Virus-like particles associated with cytopathology in the digestive gland epithelium of scallops *Pecten novaezelandiae* and toheroa *Paphies ventricosum*. *Dis. Aquat. Org.*, 29: 197-204.
- House, M.L., Kim, C.H., Reno, P.W. 1998. Soft shell clams *Mya arenaria* with disseminated neoplasia demonstrate reverse transcriptase activity. *Dis. Aquat. Org.*, 34: 187-192.

- Howard, A.W., Smith, C.S. 1983. Histological Techniques for marine bivalve molluscs. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. Woods Hole.
- Iglesias, J.I.P., Navarro, E. 1987. Relación entre reproducción y ciclo de almacenamiento de reservas en moluscos bivalvos: el berberecho *Cerastoderma edule* de la Ría de Mundaca (Vizcaya, N. España). *Cuad. Marisq. Publ. Téc.* 12: 391-394.
- Irwin, S.W.B., McKerr, G., Judge, B.C., Moran, I. 1984. Studies on metacercarial excystment in *Himasthla leptosoma* (Trematoda: Echinostomatidae) and newly emerged metacercariae. *International Journal for Parasitology*, 14: 415-421.
- Ivell, R., 1981. A quantitative study of a *Cerastoderma-Nephtys* community in the Limfjord, Denmark, with special reference to the production of *Cerastoderma edule*. *Journal of Molluscan Studies*, 47: 147-170.
- James, B.L., Bowers, E.A., Richards, J.G. 1966. The ultrastructure of the daughter sporocyst of *Cercaria bucephalopsis haimeana* lacaze-Duthiers, 1854 (Digenea: Bucephalidae) from the edible cockle, *Cardium edule* L. *Parasitology*, 56: 753-762.
- Jensen, K.T., Fernández Castro, N., Bachelet, G. 1999. Infectivity of *Himasthla* spp. (Trematoda) in cockle (*Cerastoderma edule*) spat. *J. mar. Biol. Ass. UK*, 79: 265-271.
- Jones, J.B., Scotti, P.D., Dearing, S.C., Wesney, B. 1996. Virus-like particles associated with marine mussel mortalities in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, 25: 143-149.
- Jonsson, R., André, C. 1992. Mass mortality of the bivalve *Cerastoderma edule* on the swedish west coast caused by infestation with the digenean trematode *Cercaria cerastodermæ* I. *Ophelia*, 36 (2): 151-157.
- Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.S., Farrell, J.H., Van Beneden, R.J., Reinisch, C.L., Lesser, M.P., Walker, C.W. 2001. Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene*, 20: 748-758.

- Kent, M.L., Wilkinson, M.T., Drum, A.S., Elston, R.A. 1991. Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other bivalve species. *Journal of Inv. Pathol.*, 57: 435-436.
- Kinne, O. 1980. Diseases of Marine Animals: General Aspects. En: *Diseases of Marine Animals*, Vol. I. O. Kinne (Ed.). John Wiley & Sons, New York. pp. 13-73.
- Kingston, P.F., 1974. Studies on the reproductive cycles of *Cardium edule* and *C. glaucum*. *Marine Biology*, 28 317-323.
- Klein, G. 1987. The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science*, 238: 1539-1545.
- Kristensen, I. 1958. Differences in density and growth in a cockle population in the Dutch Wadden Sea. *Archives Néerlandaises de Zoologie*, Tome XII: 350-453.
- Kurokawa, T., Suzuki, T., Okauchi, M., Miwa, S., Nagai, K., Nakamura, K., Honjo, T., Nakajima, K., Ashida, K., Funakoshi, S. 1999. Experimental infections of a disease causing mass mortalities of japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* by tissue transplantation and cohabitation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 65 (2): 241-251.
- Landsberg, J.H. 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: Is there a connection? *Journal of Shellfish Research*, 15: 203-230.
- Lasiak, T. 1991. Bucephalid Trematode infections in mytilid bivalves from the rocky intertidal of Southern Chile. *J. Moll. Stud.*, 58: 29-36.
- Lasiak, T.A. 1993. Bucephalid Trematode infections in the Brown Mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). *S. Afr. J. mar. Sci.*, 13: 127-134.
- Lauckner, G. 1971. Zur Trematodenfauna der Herzmuscheln *Cardium edule* und *Cardium lamarcki*. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, 22: 377-400.
- Lauckner, G. 1980. Diseases of mollusca: Gastropoda. En: *Diseases of Marine Animals*, Vol. I. O. Kinne (Ed.). John Wiley & Sons, New York. pp. 311-424.

- Lauckner, G. 1983. Diseases of mollusca: Bivalvia. En: *Diseases of Marine Animals*, Vol. II. O. Kinne (Ed.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 477-961
- Lauckner, G. 1987. Effects of parasites on juvenile Wadden Sea invertebrates. *Proceedings of the 5th International Wadden Sea Symposium*. Esbjerg: The National Forest and Nature Agency and Museum of Fisheries and Shipping. Esbjerg. pp. 103-121.
- Leavitt, D.F., McDowell Capuzzo J., Smolowitz, R.M., Miosky, D.L., Lancaster, B.A., Reinisch, C.L. 1990. Hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*: prevalence and indices of physiological condition. *Marine Biology*, 105: 313-321.
- Le Gall, G., Chagot, D., Mialhe, E., Grizel, H. 1988. Branchial Rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. *Dis. Aquat. Org.*, 4: 229-232.
- Lester, R.J.G. 1984. A review of methods for estimating mortality due to parasites in wild fish populations. *Helgoländer Meeresunters*, 37: 53-64.
- López, C.; de Coó, A. & García, A., 1987. Ciclo sexual do *Cerastoderma edule* L. na Ria de Arousa. *Cuadernos Marisqueiros Publicación Técnica*, 12: 395-400.
- López, C. 1995. Estudio patológico de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) cultivada en Galicia y sus mecanismos de defensa. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- Loss-Frank, B. 1967. Experimentelle Untersuchungen über Bau, Entwicklung und Systematik der Himasthlinae (Trematoda, Echinostomatidae) des Noerdseeraumes. *Z. f. Parasitenkunde*, 28: 299-351.
- Lowe, D.M., Moore, M.N. 1978. Cytological and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *J. Natl. Cancer Inst.*, 60: 1455-1459.
- Lucas, A., Beninger, P.G. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44: 187-200.

- Maillard, C. 1975. *Labratema lamirandi* (Carrère, 1937) (Trematoda, Bucephalidae) parasite de *Dicentrarchus labrax* (L., 1758). Création du genre *Labratema*. Cycle évolutif. *Bull. Mus. natn. Hist. nat.*, Paris, 3e sér., 283: 39-68.
- Mann, R. 1978. A comparison of morphometric biochemical, and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. En: *Energy and environmental stress in aquatic systems*. Thorp, J.H. & Gibbons, J.W. (Eds.). Tech. Info. Center, USDOE. pp. 484-497.
- Martin, A.G., Gérard, A., Cochenne, N., Langlade, A. 1993. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. En: Barnabé, G., Kestemont, P. (Eds.). European Aquaculture Society, Ghent, Belgium. pp. 279-286.
- Matthews, R.A. 1973. The life-cycle of *Bucephalus haimeanus* Lacaze-Duthiers, 1854 from *Cardium edule* L. *Parasitology*, 67: 341-350.
- McGladdery, S.E., Reinisch, C.L., MacCallum, G.S., Stephens, R.E., Walker, C.L., Davidson, J.T. 2001. Haemic Neoplasia in Soft-shell Clams (*Mya arenaria*): Recent Outbreaks in Atlantic Canada and Discovery of a p53 Gene Homologue Associated with the Condition. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada*, 101: 19-26.
- McLaughlin, S.M. 1994. Transmission studies of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. En: *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. Rosenfield, A., Kern, F.G. & Keller, B.J. (Eds.). U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA. pp. 21-22.
- McVicar, A.H. 1990. Epidemiology/Epizootiology: A basis for control of disease in mariculture. En: *Pathology in Marine Science*. Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (Eds.). Academic Press, INC, Gloucester Point, Virginia. pp. 397-404.
- Mejuto, J., 1984a. Contribución al estudio de la dinámica de la población de berberecho, *Cerastoderma edule* (L.), en la Ría de Noia, (Galicia). *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos*, 1: 453-467.



- Mejuto, J., 1984b. Primeros datos sobre la dinámica de la población de *Cerastoderma edule* (L.) de la Ría do Pasaxe (NW de Galicia), estrategias de explotación. *Actas do IV Simpósio Ibérico de Estudos do Benthos Marinho*, II: 83-102.
- Mix, M.C. 1975. Proliferative characteristics of atypical cells in native oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina Bay, Oregon. *J. Invertebr. Pathol.*, 26: 289-298.
- Mix, M.C. 1982. Cellular proliferative disorders in bay mussels (*Mytilus edulis*) from Oregon estuaries. *Proc. Int. Colloq. Invert. Pathol.*, 3: 266-267.
- Mix, M.C. 1983. Haemic neoplasm of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. *Journal of Fish Diseases*, 6: 239-248.
- Mix, M.C., Hawkes, J.W., Sparks, A.K. 1979. Observations on the Ultrastructure of Large Cells Associated with Putative Neoplastic Disorders of Mussels, *Mytilus edulis*, from Yaquina Bay, Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 34: 41-56.
- Mix, M.C., Schaffer, R.L., Hemingway, S.J. 1981. Polynuclear aromatic hydrocarbons in bay mussels (*Mytilus edulis*) from Oregon. En: *Phyletic Approaches to Cancer*. Dawe, C.J., Harshbarger, J.C., Kondo, S., Sugimura, T., Takayama, S. (Eds.). JPN Soc. Tokyo. pp. 167-177.
- Montes, J. 1990. Development of *Bonamia ostreae* parasitosis of flat oyster, *Ostrea edulis*, from Galicia, Northwest Spain. En: *Pathology in Marine Science*. Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (Eds.). Academic Press. pp. 223-227.
- Montes, J. 1991. Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (NW Spain). *Aquaculture*, 93: 235-239.
- Montes, J., Acosta, C.P., Guerra, A. 1989. Oyster mortality in Galicia (NW Spain). En: *Aquaculture - A Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society. Bredene, Belgium, pp. 941-948.

- Montes, J., Villalba, A., López, M.C., Carballal, M.J., Mourelle, S.G. 1991. Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, NW Spain) with different histories of oyster culture. *Aquaculture*, 93: 213-224.
- Montes, J., Anadón, R., Azevedo, C. 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63: 1-6.
- Montes, J., Lama, A., Longa, M.A. 1995. Estudio sobre la incidencia de *Bonamia ostreae* en Galicia: perspectiva histórica, situación actual y problemática. *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura*: 232-237.
- Montes, J., Ferro-Soto, B., Conchas, R.F., Guerra, A. 2003. Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture*, 220: 175-182.
- Montes, J.F., Durfort, M., García-Valero, J. 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Res.*, 279: 529-538.
- Moore, J.D., Elston, R.A., Drum, A.S., Wilkinson, M.T. 1991. Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. *Journal of Inv. Pathol.*, 58: 231-243.
- Moore, J.D., Robbins, T.T., Friedman, C.S. 2000. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal *Rickettsiales*-like prokaryote. *J. Aquat. Anim. Health*, 12: 26.
- Navarro, E., Iglesias, J.I.P. & Larrañaga, A., 1989. Interannual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca Estuary (Biscay, North Spain). *Marine Biology*, 101: 503-511.
- Newell, R.I.E. & Bayne, B.L., 1980. Seasonal Changes in the Physiology, Reproductive Condition and Carbohydrate Content of the cockle *Cardium* (= *Cerastoderma*) *edule* (Bivalvia: Cardiidae). *Marine Biology*, 56: 11-19.

- Norton, J.H., Shepherd, M.A., Abdon-Naguit, M.R., Lindsay, S. 1993. Mortalities in the giant clam *Hippopus hippopus* associated with rickettsiales-like organisms. *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 207-209.
- Novoa, B., Figueras, A. 2000. Virus-like particles associated with mortalities of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*. *Dis. Aquat. Org.*, 39: 147-149.
- O.I.E. 2002. Diagnostic manual for aquatic animal diseases, third ed., Office Internationale des Epizooties, Paris.
- Oprandy, J.J., Chang, P.W. 1983. 5-Bromodeoxyuridine Induction of Hematopoietic Neoplasia and Retrovirus Activation in the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42: 196-206.
- Oprandy, J.J., Chang, P.W., Pronovost, A.D., Cooper, K.R., Brown, R.S., Yates, V.J. 1981. Isolation of a Viral Agent Causing Hematopoietic Neoplasia in the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 45-51.
- Ordás, M.C., Gómez-León, J., Figueras, A. 2001. Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). *Journal of Shellfish Research*, 20: 1019-1024.
- Pearse, A.G.E. 1980. The chemistry and practice of fixation. En: *Histochemistry*. Pearse, A.G.E. (Ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh, 1. pp. 97-158
- Pereira, J.R., Arnaiz, R., Linares, F., González, V. 1984. Variación estacional del índice de condición, composición bioquímica y contenido energético de la población de *Cerastoderma edule* L. situada en el banco natural de "El Lombo del Ulla" (Ría de Arousa- Galicia- España). *Actas do IV Simpósio Ibérico de Estudos do Benthos Marinho*, II: 245-256.
- Pérez-Camacho, A. 1979. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767) (Mollusca, Bivalvia) con especial referencia a los factores determinantes de la producción. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

- Pérez Camacho, A. & Román, G. 1984. Crecimiento, reproducción, mortalidad y producción del berberecho *Cerastoderma edule* (L.), en la Ría de Arousa. *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos*, 1: 499-507.
- Peters, E.C. 1988. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication*, 18: 74-92.
- Poder, M., Auffret, M. 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. I. Morphology and population survey in Brittany, France. *Aquaculture*, 58: 1-8.
- Potts, M-S. 1996. Effects of Hematopoietic Neoplasia on Reproduction and Population Size Distribution in the Soft-Shell Clam. *Journal of Shellfish Research*, 15: 519.
- Rasmussen, L.P.D. 1986a. Occurrence, prevalence and seasonality of neoplasia in the marine mussel *Mytilus edulis* from three sites in Denmark. *Marine Biology*, 92: 59-64.
- Rasmussen, L.P.D. 1986b. Virus-Associated Granulocytomas in the Marine Mussel, *Mytilus edulis*, from Three Sites in Denmark. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 117-123.
- Ray, S.M. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, 54: 55-69.
- Reinisch, C.L., Charles, A.M., Stone, A.M. 1984. Epizootic neoplasia in soft shell clams collected from New Bedford Harbor. *Hazard. Waste*, 1: 73-81.
- Renault, T., Cochenec, N. 1994. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, 64: 160-162.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., Maffat, P. 1994. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – a comparative review. *Rev. Méd. Vét.*, 145: 735-742.

- Robert, R.M., Borel, M., Pichot, Y., Trut, G. 1991. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living. Resour.*, 4: 265-274.
- Robledo, J.A.F. 1994. Parásitos del mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk. cultivado experimentalmente en la Ría de Vigo: Epizootiología, histopatología y mecanismos de defensa. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Robledo, J.A.F., Santarem, M.M., Figueras, A. 1994. Parasite loads of rafted blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Spain with special reference to the copepod, *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture*, 127: 287-302.
- Robledo, J.A.F., Figueras, A. 1995. The effects of culture-site, depth, season, and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from Galicia, Spain. *J. Parasitol.*, 81: 354-363.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172: 125-145.
- Rodriguez, H., Soto, M., Arias, C., Estévez, J. 1997. A case of disseminated haemic sarcoma in *Cerastoderma* (= *Cardium*) *glaucum* Poiret, 1789 collected from Ría de Vigo (NW Spain). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 17: 88-90.
- Romalde, J.L., Rodríguez, J.M., Beaz, R., Vilarinho, M.L., Carballal, M.J., Díaz, S., Villalba, A. 2005. Evidences for retroviral etiology of the disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). National Shellfisheries Association Meeting. Philadelphia.
- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., García-Martín, L.O., Sánchez López, J.L. 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 155: 249-262.
- Russell-Pinto, F. 1990a. Infection of *Cerastoderma edule* and *Scrobicularia plana* (Bivalvia) by *Meiogymnophalus minutus* and *Meiogymnophalus fossarum* (Digenea) in the Ría de Aveiro (Portugal). *4th Internat. Colloq. Pathol. Marine Aquacul.*: 99-100.

- Russell-Pinto, F. 1990b. Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus* Metacercariae (Gymnophallidae) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia): Possible species coexistence in Ría de Aveiro. *J. Parasitol.*, 76 (5): 653-659.
- Russell-Pinto, F. 1993. Espécies de Digenea que infectam *Cerastoderma edule* (N.V. Berbigao) em Portugal. Caracterização da resposta do hospedeiro à infestação. Tesis doctoral. Universidade de Porto.
- Russell-Pinto, F., Bartoli, P. 1992. Sympatric distribution of *Meiogymnophallus minutus* and *M. fossarum* (Digenea: Gymnophallidae) in *Cerastoderma edule* in the Ría de Aveiro estuary in Portugal. *Parasitol. Res.*, 78: 617-618.
- Russell-Pinto, F., Bowers, E.A. 1998. Ultrastructural studies on the tegument of the metacercariae of *Meiogymnophallus minutus* and *Meiogymnophallus fossarum* (Digenea: Gymnophallidae) in *Cerastoderma edule* (Bivalvia) from Portugal. *J. Parasitol.*, 84 (4): 715-722.
- Rygg, B., 1970. Studies on *Cerastoderma edule* (L.) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret). *Sarsia*, 43: 65-80.
- Sannia, A., James, B.L. 1978. The occurrence of *Cercaria cerastodermæ* I Sannia, James, and Bowers, 1978 (Digenea: Monorchidae) in populations of *Cerastoderma edule* (L.) from the commercial beds of the lower Thames Estuary. *Z. Parasitenkd.*, 56: 1-11.
- Sannia, A., James, B.L., Bowers, E.A. 1978. The morphology of *Cercaria cerastodermæ* I nom. nov. (Monorchidae) (= *Cercaria lepidapedon rathon* (Cobbold, 1858) *sensu* Lebour, 1908) a rare digenean parasite of the cockle in Britain. *J. nat. Hist.*, 12: 487-500.
- Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). En: *Reproduction of Marine Invertebrates. Molluscs: Pelecypods and lesser classes*. Vol. V. Giese, A.C., Pearse, J.S. (Eds.). Academic Press. pp. 113-292.



- Seed, R. & Brown, R.A., 1975. The influence of reproductive cycle, growth, and mortality on population structure in *Modiolus modiolus* (L.), *Cerastoderma edule* (L.) and *Mytilus edulis* L., (Mollusca: Bivalvia). *Proceedings of the 9th European marine biological Symposium*: 257-274.
- Shafee, M.S. & Daoudi, M., 1991. Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Morocco. *Aquaculture and Fisheries Management*, 22: 203-216.
- Shaw, B.L., Battle, H. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*, 35: 325-347.
- Sindermann, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish. Vol. 2 (second edition). Academic Press. 516 pp.
- Smolarz, K., Renault, T., Soletchnik, P., Wolowicz, M. 2005. Neoplasia detection in *Macoma balthica* from the Gulf of Gdansk: comparison of flow cytometry, histology and chromosome analysis. *Dis. Aquat. Org.*, 65: 187-195.
- Smolowitz, R.M., Reinisch, C.L. 1986. Indirect peroxidase staining using monoclonal antibodies specific for *Mya arenaria* neoplastic cells. *J. Invertebr. Pathol.*, 48: 139-145.
- Smolowitz, R.M., Miosky, D., Reinisch, C.L. 1989. Ontogeny of Leukemic Cells of the Soft Shell Clam. *Journal of Inv. Pathol.*, 53: 41-51.
- Sousa, W.P. 1991. Can Models of Soft-Sediment Community Structure Be Complete Without Parasites? *Amer. Zool.*, 31: 821-830.
- Sparks, A.K. 1985. Synopsis of Invertebrate Pathology. Exclusive of Insects. Elsevier, Amsterdam. 423 pp.
- Sparks, A.K. 1993. Invertebrate Diseases - An Overview. En: *Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*. Couch, J.A. & Fournie, J.W. (Eds.). CRC Press. pp. 245-253

- Steele, S., Mulcahy, M.F. 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 79: 673-686.
- Stunkard, H.W. 1938. The morphology and life cycle of the trematode *Himasthla quissetensis* (Miller and Northup, 1926). *Biol. Bull. Mar. biol. Labor. Wood's Hole*, 75: 145-164.
- Stunkard, H.W. 1940. Life history studies and the development of parasitology. *J. Parasit.*, 26: 1-15.
- Sunila, I. 1991. Respiration of sarcoma cells from the soft-shell clam *Mya arenaria* L. under various conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 150: 19-29.
- Sunila, I. 1992. Serum-cell interactions in transmission of sarcoma in the soft-shell clam, *Mya arenaria* L. *Comp. Biochem. Physiol. A* 102: 727-730.
- Sunila, I. 1994. Viral transmission and tumor promotion of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. En: *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. Rosenfield, A., Kern, F.G. & Keller, B.J. (Eds.) U.S. Department of Commerce, Woods Hole, M.A., pp. 3-5.
- Suzuki, S., Kamakura, M., Kusuda, R. 1998. Isolation of Birnavirus from japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fisheries Science*, 64 (2): 342-343.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F. 1984. A proliferative disorder of possible hemic origin in the common cockle, *Cerastoderma edule*. *Journal of Inv. Pathol.*, 44: 109-111.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F. 1988a. Epizootiological aspects of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.*, 5: 225-238.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F. 1988b. Transmission of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Mollusca) using cell transplants. *Developmental and Comparative Immunology*, 12: 195-200.
- Van Beneden, R.J., Gardner, G.R., Blake, N.J., Blair, D.G. 1993. Implications for the presence of transforming genes in gonadal tumors in two bivalve mollusk species. *Cancer Research*, 53: 2976-2979.

- Venier, P., Pallavicini, A., Nardi (de), B., Lanfranchi, G. 2003. Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene*, 314: 29-40.
- Villalba, A. 1995. Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (NW Spain). *Aquaculture*, 130: 269-277.
- Villalba, A., Mourelle, S.G., López, M.C., Carballal, M.J., Azevedo, C. 1993a. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, 16: 61-72.
- Villalba, A., Mourelle, S.G., Carballal, M.J., López, M.C. 1993b. Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 17: 205-213.
- Villalba, A., López, C., Carballal, M.J. 1993c. Parásitos y alteraciones patológicas de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, y *Venerupis rhomboides*, en las Rías Gallegas. *Actas IV Congreso Naional de Acuicultura*: 551-556.
- Villalba, A., Peters, E.C., López, M.C., Carballal, M.J. 1995. Disseminated sarcoma in the clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). *Journal of Inv. Pathol.*, 65: 76-78.
- Villalba, A., Mourelle, S.G., Carballal, M.J., López, C. 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture procces in the Rías of Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 31: 127-139.
- Villalba, A., Carballal, M.J., López, C., Cabada, A., Corral, L., Azevedo, C. 1999. Branchial rickettsia-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. *Dis. Aquat. Org.*, 6: 53-60.
- Villalba, A., Carballal, M.J., López, C. 2001. Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 46: 213-216.

- Villalba, A., Casas, S.M., López, C., Carballal, M.J. 2005. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, 65: 257-267.
- Weinberg, J.R., Leavitt, D.F., Lancaster, B.A., McDowell Capuzzo, J. 1997. Experimental Field Studies with *Mya arenaria* (Bivalvia) on the Induction and Effect of Hematopoietic Neoplasia. *Journal of Inv. Pathol.*, 69: 183-194.
- Wolowicz, M., 1987. A comparative study of the reproductive cycle of cockles *Cardium glaucum* (Poiret 1789) and *C. hauriense* (Petersen Russell 1971) - (Bivalvia) from the Gdansk Bay. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 34: 91-105.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Ratcliffe, N.A. 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15: 195-210.
- Yankson, K., 1986. Reproductive cycles of *Cerastoderma glaucum* (Bruguière) and *C. edule* (L.) with special reference to the effects of the 1981-82 severe winter. *Journal of Molluscan Studies*, 52: 6-14.
- Yevich, P.P., Barszcz, C.A. 1976. Gonadal and hematopoietic neoplasms in *Mya arenaria*. *Mar. Fish. Rev.*, 38: 42-43.
- Yevich, P.P., Barszcz, C.A. 1977. Neoplasia in Soft-Shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. *Ann. NY Acad. Sci.*, 298: 409-426.